



UNIVERSITA' DI PISA

Corso di Laurea Magistrale in Medicina Veterinaria

***Esperienze applicative dell'ecografia
trans-vaginale ai fini diagnostici di gravidanza
nella bovina presso il Centro Interdipartimentale
"E.Avanzi" dell'Università di Pisa***

Candidato: Botta Roberto

Relatori: Prof., Aria Giorgio

Dott. Sbrana Alberto

ANNO ACCADEMICO 2005-2006

*Alla mia famiglia,
Al mio Maestro Giorgio*

Riassunto

Parole chiave: bovina, diagnosi di gravidanza, ecografia trans-vaginale, ecografia retto-vaginale.

La presente indagine riferisce i risultati ottenuti dall'applicazione di una tecnica diagnostica di gravidanza su base ecografica trans-vaginale in 150 bovine da latte, stabulate presso l'azienda zootecnica del Centro Interdipartimentale "E. Avanzi" di S. Piero a Grado (Pisa). Il metodo impiegato, sfruttante una sonda ecografica convex da 5MHz, montata su di un supporto cilindrico che ne permettesse l'introduzione sino al fornice cervicale, è risultato semplice, efficace, poco invasivo e soprattutto veloce ai fini almeno di una prima discriminazione tra soggetti gravidi e non. In prove di campo l'affidabilità del metodo è risultata particolarmente buona tra il 30° ed il 35° giorno di gravidanza, in cui precisione ed accuratezza delle diagnosi positive formulate per via trans-vaginale semplice risultano particolarmente elevate. Condizioni di ripienezza dell'alvo e/o di discesa dell'utero ipertrofico al di là del pettine del pube, talora hanno, però, suscitato difficoltà diagnostiche o dubbi interpretativi, facilmente dissipabili con una retrazione manuale dell'utero per via trans-rettale verso la cavità pelvica (metodo da noi definito "*retto-vaginale*"). Analogamente alle diagnosi dubbie anche tutti i giudizi apparentemente negativi all'esame trans-vaginale semplice, prima della loro formalizzazione in una diagnosi definitiva ed ancor più in una prescrizione terapeutica, richiedono sempre un supplemento confermativo d'indagine per via retto-vaginale. Non dimentichiamo, infine, che tutte le diagnosi positive specie se emesse in fasi precoci, richiedono sempre una ri-conferma diagnostica più tardiva (almeno oltre il 35° - 40° giorno), anche a causa dei possibili fenomeni di mortalità embrionale presenti e rilevati anche nella nostra casistica, sia pur senza alcuna apparente correlazione con la metodica applicata.

Abstract

Key Words: Cow; Pregnancy diagnosis; Trans-vaginal ultrasonography; Vaginal and recto-vaginal ultrasonography.

In intensive cow-breeding, ultrasonography has not yet gained the same on-field diffusion as in other zootechnic species. For genital apparatus, trans-cutaneous investigations don't give any applicable result, classic trans-rectal approach always requires specific protection of instruments and practitioners against abundant fecal contamination, while trans-vaginal approach has been developed essentially for ovarian follicular sampling. On these bases and with the aim to find an easy screening-method for a rapid differentiation between pregnant and non-pregnant cows, firstly we attempted a simple trans-vaginal approach on some 35 days-pregnant cows, on which echographic findings promptly confirmed the positive clinical status. The technique, based on a 5MHz convex transducer (with a tubular extension to achieve the bottom of the vagina), provided an easy, safe, reliable and relatively clean method to scan inner genital apparatus. In order to evaluate the feasibility of the technique, we then applied the method on 150 inseminated cows of unknown reproductive status, integrating all negative diagnosis with trans-rectal ultrasonographic confirmative examinations. At simple vaginal examination, rectal repletion and displacement of the uterus out of the pelvic rim, sometimes raised diagnostic difficulties or doubts, easily dissipable with a trans-rectal manual retraction of the uterus in front of the transducer (*bimanual or recto-vaginal method*). This report compares the simple, bimanual trans-vaginal and trans-rectal findings at different pregnancy phases (from 21 to > 50 days), showing reliability, sensibility and temporal limits of these different approaches. On our farm conditions simple trans-vaginal method showed the faster and more reliable findings between 30th and 35th days of pregnancy (2-4 cm of horn diameter), even if, for correct reproductive management, owing also to physiologic embryonic losses, early diagnosis should be ever re-confirmed later.

INDICE GENERALE

1. PREMESSE E SCOPI DELLA TESI	pag. 05
2. STUDIO BIBLIOGRAFICO PROPEDEUTICO	
2.1 RUOLO E CONVENIENZA DELLA DIAGNOSI ECOGRAFICA IN BUIATRIA	pag. 06
2.2 FONDAMENTI DI TECNICA ECOGRAFICA	pag. 09
2.3 GENERALITÀ DELL'ECOGRAFIA OSTETRICO-GINECOLOGICA PER VIA TRANS-RETTALE NELLA SPECIE BOVINA	pag. 12
2.3.1 REPERTI OVARICI	pag. 13
2.3.2 REPERTI UTERINI NELLA BOVINA NON GRAVIDA	pag. 14
2.3.3 REPERTI ECOGRAFICI NEI PRIMI 90 GIORNI DI GRAVIDANZA	pag. 17
2.3.4 INDIVIDUAZIONE ECOGRAFICA DEL SESSO DEL FETO	pag. 22
2.4 ENDOMETRITE E PIOMETRA	pag. 23
2.5 MORTALITA' EMBRIONALE PRECOCE	pag. 28
2.6 CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE	pag. 36
3. STUDIO SPERIMENTALE	
3.1 INTRODUZIONE	pag. 37
3.2 MATERIALI E METODI	pag. 40
3.2.1 CASISTICA	pag. 40
3.2.2 STRUMENTAZIONE	pag. 41
3.2.3 MODALITA' OPERATIVE	pag. 42
3.3 OSSERVAZIONI ED ACCORGIMENTI TECNICO APPLICATIVI	pag. 44
3.4 RISULTATI	pag. 47
4. ANALISI E DISCUSSIONE	pag. 51
5. CONCLUSIONI	pag. 55
BIBLIOGRAFIA	pag. 61
RINGRAZIAMENTI	
Allegati: TABELLE	

PREMESSE E SCOPI DELLA TESI

La presente tesi si propone innanzitutto di formulare un'attenta analisi dell'impatto clinico, tecnico ed economico delle procedure ecografiche in ambito zootecnico e buiatico, in particolare. Negli animali da reddito, infatti, l'elevato costo iniziale delle apparecchiature ecografiche ha per lungo tempo scoraggiato e limitato il ricorso a questa metodica d'indagine diagnostica che oggi si sta invece sempre più confermando un supporto di grande valore ed utilità a "complemento" o meglio ancora a "completamento" della visita clinica. Nonostante nel tempo si siano individuati numerosi aspetti applicativi dell'ecografia in campo bovino (basti pensare all'ecografia del fegato, dell'abomaso, dell'intestino, della mammella, dell'ombelico ecc... che non saranno oggetto di questa trattazione) è il settore ostetrico ginecologico che ne risulta maggiormente avvantaggiato, sia per frequenza di applicazioni che per attendibilità ed utilità pratica delle informazioni dettagliate che da essa possono derivare.

Rimanendo pur sempre in questo contesto, ma scendendo nel dettaglio, nella sezione sperimentale, successiva all'ampia trattazione propedeutica dei riscontri ottenibili dall'ecografia ostetrico-ginecologica "classica" per via trans-rettale, ci siamo proposti di valutare l'eventuale applicabilità dell'ecografia uterina per via trans-vaginale ai fini di una diagnostica di gravidanza precoce e rapida e soprattutto operativamente più pratica sia per l'operatore sia per il paziente.

2. STUDIO BIBLIOGRAFICO PROPEDEUTICO.

2.1 RUOLO E CONVENIENZA DELLA DIAGNOSI ECOGRAFICA IN BUIATRIA.

La progressiva intensivazione e razionalizzazione delle tecniche d'allevamento delle bovine lattifere se da un lato ha permesso un innegabile incremento delle produzioni, di contro ha ridotto i margini di sfruttamento potenziale di questi soggetti, dai quali si pretende spesso uno sforzo lattogenico ai limiti delle loro potenzialità fisiologiche.

Alla massimalizzazione delle produzioni in assenza di adeguati periodi di recupero fisico e funzionale ed alla stabulazione in ambienti *virtuali* che nulla hanno più a che vedere con l'ambiente agreste o perlomeno agricolo, al quale questi animali erano originariamente destinati, ha corrisposto una drastica riduzione di altri aspetti produttivi non secondari tra cui, in primo luogo, la fertilità, la carriera riproduttiva (ridotta ormai a soli tre parti/bovina a causa del precoce esaurimento fisico e funzionale) e la sensibilità agli agenti patogeni (patologie del piede, della mammella, dell'apparato digerente, del metabolismo, dell'utero in fase puerperale...).

Ogni tappa della conduzione aziendale e della vita produttiva delle "fatrici" è rigidamente programmata e pre-organizzata e persino molti dei più moderni e razionali aspetti gestionali, apparentemente migliorativi del benessere animale (vedi le nuove tecniche di stabulazione e di climatizzazione ambientale) nascondono in realtà il fine ultimo di evitare ogni possibile flessione produttiva e/o di elevare le caratteristiche qualitative del prodotto finale.

Agli animali, sia pur altamente selezionati, sono richieste prestazioni sempre più elevate, senza nulla voler cedere a compensazione di tali straordinari incrementi produttivi.

Critici risultano tutti i tempi produttivi e riproduttivi, tra cui la durata della lattazione e del puerperio, l'intervallo parto/nuovo concepimento e soprattutto il periodo di interparto. Non sono concesse "*defaillance*" riproduttive che possano allungare gli intervalli interparto, e, a tale scopo, la fase puerperale deve essere costantemente monitorata per prevenire e/o diagnosticare precocemente ogni anomalia di natura infiammatoria o disfunzionale a carico dell'apparato genitale nel corso della sua involuzione fisiologica.

Anche dal punto alimentare tali soggetti richiedono una continuativa attenzione volta a evitare o colmare prontamente ogni insufficienza metabolica con un apporto alimentare adeguato sia sul piano qualitativo che quantitativo.

La capacità di reggere alla frenetica competizione imposta da un mercato che da anni stenta a riconoscere il reale valore di un prodotto alimentare così strategico quale il latte, dipende quindi sempre più da una crescente esigenza produttiva in un sistema di allevamento alienato ed alienante caratterizzato da una intrinseca fragilità, connessa alla disponibilità di riproduttori sempre delicati ed a sistemi di gestione sempre più complessi e rigidi.

I soggetti che non dovessero riuscire a mantenersi al passo con questi parametri sono destinati ad una riforma precoce ed alla loro pronta sostituzione. La quota di rimonta negli allevamenti "di punta" ha ormai raggiunto tassi così elevati che la stessa azienda non riesce a farvi fronte e necessita spesso l'acquisizione di giovani manze dal mercato esterno, con ulteriori rischi di carattere igienico-sanitario.

Anche se queste tipologie di allevamento tendono ormai a sostituire piuttosto che a curare o a recuperare i soggetti che non rispondano appieno alle aspettative dell'allevatore, al veterinario d'azienda, oltre ad un maggior impegno, viene richiesto anche il ricorso a tecnologie che lo aiutino a migliorare la qualità, la tempestività e l'attendibilità e l'efficacia delle sue prestazioni diagnostiche e cliniche.

In un contesto produttivo così frenetico anche l'approccio ecografico, che nell'allevamento tradizionale trovava difficoltà ad affermarsi per gli alti costi di gestione, trova invece giustificazione, rendendosi utile al monitoraggio dell'involuzione uterina, al precoce riscontro di condizioni patologiche o disfunzionali a carico dell'utero e delle ovaie, all'individuazione precoce dei soggetti gravidi, al riscontro di episodi di mortalità embrionale precoce, per spingersi a prestazioni tecnicamente più specialistiche connesse al sessaggio del feto ed alle operazioni di superovulazione, trasferimento embrionale o di ovum pick-up per la produzione di embrioni in vitro.

In considerazione dell'ampia gamma di aspetti applicativi anche l'approccio ecografico sta subendo una profonda rivalutazione, presentandosi come un possibile ausilio per il recupero di giorni "vuoti". Basti pensare che oltre i 100 giorni dal parto, il costo medio di un ulteriore giorno "*open*" (= *vuoto*) per vacca è stimabile in circa 4 euro. Paradossalmente, quindi, un semplice allungamento dell'intervallo parto-concepimento di 10 giorni calcolato su un a mandria costituita anche di soli 60 capi in lattazione (su 120 totali, come nel caso della nostra azienda) comporterebbe una perdita netta di 2400 euro/anno ^[31, 32, 21, 20, 62].

Dall'altra parte, dalle analisi economiche fino ad oggi effettuate è emerso che, nonostante le spese di acquisto ed ammortamento dello strumentario, il ritorno economico è comunque vantaggioso in quanto l'applicazione sistematica del metodo va a ridurre

sensibilmente il periodo parto-concepimento. Infatti un sistematico utilizzo porterebbe ad un abbassamento delle spese di management aziendale, riferendoci soprattutto al recupero ed al controllo dei soggetti “patologici”, (al fine di ottenere una riduzione dell’intervallo parto-concepimento) e del numero medio degli interventi fecondativi che vanno ad ammortizzare le relative spese di gestione e, non meno importante, l’impegno del personale di stalla. Oneri questi nel complesso inferiori alla perdita economica per soggetto vuoto/giorno. Il guadagno sarà ovviamente più evidente in quelle aziende in cui vi sia una situazione riproduttiva relativamente scadente (numero di interventi fecondativi/gravidanza elevato, intervalli parto/concepimento ed interparto protratti) ed è solo con l’introduzione di tali pratiche che potremmo avvicinarci ai livelli produttivi degli altri stati europei in cui la loro applicazione è ormai routinaria ^[31, 32, 21, 20, 62].

2.2 FONDAMENTI DI TECNICA ECOGRAFICA^[4].

L'ecografo è uno strumento essenzialmente in grado di emettere ultrasuoni e di captarne gli echi di ritorno (riflessi), che trasformati in segnali elettrici vengono elaborati per via informatica e proiettati su uno schermo (tubo a raggi catodici od oscilloscopio) a formare un'immagine in tempo reale (real-time) della sottile sezione o scansione tissutale attraversata dagli ultrasuoni stessi.

Lo strumento è composto da una sonda o *transducer* (che emette e capta ultrasuoni) connessa con un cavo ad un elaboratore fornito di schermo catodico.

Attualmente sono disponibili sonde *lineari e convesse*, costituite di cristalli di quarzo disposti in serie (che producono immagini di forma pressoché rettangolare), e *sonde settoriali*, che richiedono una superficie di contatto minore in quanto dotate di un movimento oscillante meccanico della fonte di ultrasuoni (queste ultime forniscono una tipica scansione di forma divergente triangolare).

In sintesi la sequenza di eventi, che produce immagini in successione così rapida da fornire anche l'idea del movimento, si può riassumere nel seguente modo: 1) la corrente elettrica induce rapida vibrazione dei cristalli di quarzo; 2) si genera in tal modo un fascio di onde o ultrasuoni; 3) gli ultrasuoni penetrano nei tessuti ed all'interfaccia tra tessuti di densità differente vengono riflessi; 4) le onde riflesse ritornano ai cristalli che, in fase di riposo, al riceverle ne subiscono delle deformazioni; 5) le deformazioni suscitano impulsi elettrici di differente intensità che sono tradotti sullo schermo in punti di differente intensità di grigio, i quali nell'insieme definiscono un'immagine in bianco e nero della sezione degli organi e tessuti attraversati.

ULTRASUONI. - Gli ultrasuoni sono onde sonore ad altissima frequenza, non percepibili dall'orecchio umano, e caratterizzati da tre parametri essenziali:

- a) la **lunghezza d'onda** (spazio percorso in linea retta da ogni onda in un singolo ciclo = distanza cresta-cresta);
- b) la **frequenza** (numero di oscillazioni/secondo; si misura in Hertz o Hz; in ecografia si utilizzano frequenze comprese tra 1 e 10 milioni di Hz o 1 – 10 MHz., Mega-Hertz). Dalla frequenza dipende la profondità di penetrazione nei tessuti molli (es.: 10 MHz. = 4 cm; 1 MHz. = 30 cm). In Veterinaria si utilizzano per lo più sonde da 3,5-5 MHz. che permettono di raggiungere oltre i 10 cm di profondità. Alla frequenza è correlato anche il potere di

risoluzione (cioè la capacità di distinguere tra due punti ecogenici vicini) [la sonda da 5 MHz. permette un potere di risoluzione di circa 1 mm, mentre, la sonda da 8MHz. consente una risoluzione pari a 0,5 mm.].

c) La **velocità di propagazione** (numero di metri al secondo). La velocità di propagazione si ottiene dal prodotto tra frequenza e lunghezza d'onda. Detta velocità varia in forma inversamente proporzionale alla densità specifica del mezzo (tessuto) da attraversare. Gli ultrasuoni si propagano a fatica nei gas e non si propagano affatto nel vuoto. Nei tessuti molli e nell'acqua, invece, la velocità di propagazione si aggira sui 1540 m/sec. Le immagini ecografiche più nette e dettagliate si ottengono con le frequenze più elevate e lunghezza d'onda ridotte, ma il tutto a scapito della profondità di penetrazione

Attraversando i tessuti le onde ultrasonore, oltre ad attenuarsi progressivamente per assorbimento, vengono in parte riflesse (echi p.d.) ed in parte rifratte (no echi). Per captare gli echi di ritorno la sonda dovrà essere mantenuta in posizione perpendicolare all'organo da esaminare. Gli echi più prossimi alla sonda avranno un'ampiezza maggiore, mentre, quelli più profondi presenteranno un'ampiezza ridotta.

La sonda emette ultrasuoni per circa un microsecondo (10^{-6} sec.), poi si blocca per fungere da apparato di ricezione per un periodo più lungo. In pratica l'emissione di ultrasuoni si ha ogni millisecondo (10^{-3} sec.). Lo schermo (oscilloscopio) traduce le differenze di potenziale tra emissione e ricezione fornendo una scansione o sezione tomografica dell'organo.

In base all'intensità dell'onda di ritorno si avranno *punti bianchi per i tessuti ecogenici e punti grigi più o meno intensi per i tessuti anecogenici* (pixel neri per i liquidi che si evidenzieranno, quindi, particolarmente bene).

SISTEMI DI MONITORAGGIO DELLE IMMAGINI. – L'elaboratore computerizzato è in grado di modulare gli echi di ritorno, amplificando quelli più lontani (*far-gain*) o, alternativamente, quelli più vicini (*near-gain*) od entrambi (*all-over-gain*) in modo da ottimizzare le immagini. E' un'opzione paragonabile alla regolazione del volume di una radio. Non mancano poi altri sistemi:

- di regolazione della luminosità o contrasto dell'immagine,
- di zoom,
- di fermo immagine (o *freezing*),
- di memorizzazione,

- di misurazione,
- di scrittura ed identificazione dell'immagine e del paziente,
- di fotografia,
- di videoregistrazione etc...

ARTEFATTI E DISTORSIONI. – Tra le più comuni alterazioni delle immagine ricordiamo: la riflessione speculare, le immagini di rinforzo, le ombre da blocco o da deviazione del raggio (che si traducono in colonne nere sottostenti a strutture iperecogene).

2.3 GENERALITÀ DELL'ECOGRAFIA OSTETRICO-GINECOLOGICA PER VIA TRANS-RETTALE NELLA SPECIE BOVINA

Premesso che l'indagine ecografica con approccio transrettale costituisce un esame clinico collaterale di indiscutibile valore che permette:

di rilevare e confermare caratteri fisiologici e patologici a carico dell'utero e delle gonadi;

di elevare le capacità interpretative dei riscontri clinici;

di anticipare l'accertamento clinico di gravidanza;

di osservare la vitalità del feto;

di individuare il sesso del feto in momenti specifici di gravidanza;

in questa prima parte, essenzialmente propedeutica al nostro lavoro, ci siamo proposti di condurre una trattazione bibliografica approfondita dei principali quadri fisiologici e clinico-patologici connessi all'apparato genitale della bovina che possano in qualche modo interferire o richiedere una diagnostica differenziale all'atto della diagnosi di gravidanza, allo scopo di evidenziarne i riscontri ecografici specifici e poterli confrontare con quelli ottenuti nel corso delle nostre indagini per via trans-vaginale.

Saranno pertanto oggetto della nostra attenzione:

I reperti fisiologici e patologici a carico delle ovaie, dell'utero non gravido, dell'utero nel corso dei primi 90 giorni di gravidanza (compresi gli elementi che permettono l'individuazione del genere dell'embrione), nonché l'incidenza ed i quadri ecografici connessi all'endometrite ed al fenomeno della mortalità embrionale precoce.

2.3.1 REPERTI OVARICI^[44].

FISIOLOGICI (follicoli e corpi lutei). - A livello ovarico è possibile seguire l'attività follicologena ciclica (evidenzia follicoli di >3 mm di diametro). Permette di evidenziare follicoli dominanti ovulatori e non, che a seconda dei soggetti compaiono ogni 7-10 giorni. Le pareti del follicolo sono molto sottili. L'ovulazione è evidenziata solo dalla scomparsa del follicolo ovulatorio del diametro di circa 15 mm di diametro (non si vede la fossetta ovulatoria). Il C.L. sarà rilevabile solamente dal 3-4° giorno di metaestro come struttura ipoecogena di 14x20 mm circa. Al 8° giorno il 30-50% dei CC.LL. presenta una cavità anecogena (nera) abbastanza ampia che progressivamente regredisce (CL cavitario = non necessariamente patologico di circa 20-30 mm di diametro). Al 13° giorno solo il 30% dei corpi lutei presenta ancora residui della suddetta cavità.

PATOLOGICI (cisti ovariche). - Ecograficamente le cisti si differenziano dai follicoli per le dimensioni della loro cavità, superiori a quelle dei follicoli, per lo spessore delle pareti, almeno per quelle più intensamente luteinizzate, e , in alcuni casi, per la forma, che in presenza di cisti multiple può addirittura apparire schiacciata, irregolare, poligonale con protrusione reciproca tra cisti più tese e meno tese. In generale, per via ecografica si distinguono bene cisti a pareti sottili (follicoliniche) e cisti a pareti molto spesse luteinizzate (luteiniche), ma, sono altresì reperibili anche forme intermedie o miste di difficile classificazione sia anatomica sia funzionale sia clinica. Sono possibili anche cisti apparentemente non interferenti sulla attività ciclica del soggetto.

2.3.2 REPERTI UTERINI NELLA BOVINA NON GRAVIDA.

L'UTERO "VUOTO" O NON GRAVIDO. - Appoggiando la sonda lineare sul piano sagittale ed in direzione dorso-ventrale all'utero si ottiene una sezione longitudinale dell'organo. Ruotando, poi, la sonda delicatamente sul lato destro e sinistro si possono evidenziare le corna. In tal modo si pone in buona evidenza la grande curvatura, che appare delimitata da una sottile linea ipoecogena che separa la parete dell'utero dal restante tessuto periferico un po' meno ecogeno. La piccola curvatura - margine mesometriale dell'utero - è di solito meno evidente e presenta una intensità ecogenica variabile. In presenza di un tono uterino elevato (al calore), analogamente alla grande curvatura, anche la piccola assume una disposizione arcuata a forma di "U". Le sezioni dorsale e ventrale dello stesso corno sono in altri momenti funzionali così prossime l'una all'altra da risultare, talora, separate solamente da un'unica linea iperecogena, o da apparire divergenti con un'angolazione molto acuta.

L'intera lunghezza del corno uterino, spazialmente disposto a spirale, di solito, può essere compreso in un'unica immagine solo quando l'utero sia in posizione ottimale e la sonda formi un angolo acuto rispetto all'asse longitudinale della bovina. Il fascio di ultrasuoni deve essere *orientato* cioè ruotato debolmente dalla posizione dorsoventrale a quella dorso-laterale. Nella maggior parte dei casi appare quindi, quasi impossibile ottenere in un'unica scansione l'intera curvatura di un corno. In grazia della sua posizione ricurva, può essere, piuttosto, sezionato contestualmente in più punti, fornendo sulla stessa schermata da due a quattro sezioni delle corna ^[71]. Anche in caso di gravidanza precoce le pareti delle corna uterine, unitamente al loro contenuto (vescicola embrionale, fluidi, annessi placentari) saranno sezionate a differenti livelli e solamente in circostanze occasionali sarà possibile comprendere in un'unica scansione l'intera lunghezza di una vescicola embrionale.

La disponibilità di una sonda settoriale, grazie alla sua maggior manovrabilità in ambito rettale, offre l'opportunità di ottenere una varietà di sezioni più ampia. il piano di sezione divergente, consente, infatti, una rotazione progressiva dall'asse longitudinale dell'animale sino a raggiungere il piano perfettamente trasverso, *tagliando* l'utero in molti piani obliqui differenti, costituiti spesso da quattro sezioni (due per ogni singolo corno).

Guidando appropriatamente la sonda dalla disposizione mediale a quella laterale si potrà seguire la curvatura del corno. In tal modo nel corso della fase luteinica si avrà l'impressione che l'estremità del corno uterino si spiralizzi portandosi in posizione più dorso-caudale rispetto alle 24 ore che precedono e seguono il calore ^[65]. Nella fase preovulatorio

l'estremità delle corna sono dirette più orizzontalmente, in direzione caudo-laterale senza arrotolarsi in direzione dorsale. La piccola curvatura descrive un raggio più ampio durante questa fase, rispetto al diestro. Pertanto la forma a spirale dell'utero risulta più pronunciata nelle fasi di progesteronemia più elevate.

Una sezione trasversale di corno uterino presenta una trama ad ecogenicità variabile caratterizzata da punti, irregolari e aspetto granuloso. Al centro dell'organo la giustapposizione delle superfici epiteliali del lume spesso producono una linea iperecogena. Detto aspetto si riscontra sempre in posizione centrale dall'apice del corpo alla cervice. Nel corso del diestro, normalmente, non sono presenti accumuli di una qualche entità di liquidi anecogeni confluenti. In condizioni particolari, ed in alcune fasi del ciclo sarà, invece, reperibile la presenza di piccole cavità di qualche millimetro di diametro che si susseguono lungo il lume uterino. Ciò avviene con maggior frequenza durante l'estro e, talora, nel diestro. Queste piccole cavità al loro interno non presentano echi e possono essere riscontrate in varie sezioni dell'utero ^[64]. Nella fase estrale, in particolare, la quantità di liquidi accumulata varia considerevolmente raggiungendo, talora, anche diversi centimetri.

Parecchi ricercatori hanno tentato di stabilire se vi fossero delle correlazioni tra quadri ecografici e specifiche fasi del ciclo. Nelle manze lo spessore delle corna uterine, valutato misurando le modificazioni dei diametri dorsale, craniale e ventrale delle corna si è rivelato per tutti e tre i diametri più elevato all'estro. Gli stessi diametri tendono a diminuire nel metaestro, per ridursi ancor più nel diestro iniziale. Le corna, poi, si ispessiscono nuovamente a metà del ciclo (9°-14° dì) e al 16° dì si osserva un nuovo calo. Stando a tali osservazioni si può, quindi, affermare che lo spessore delle corna si modifica in funzione del ciclo ^[74, 65].

In occasione dell'estro un'ampia proporzione di manze presenta anche accumulo di fluidi (metà delle manze al calore pieno ed un terzo il giorno precedente l'estro). Risulta importante sottolineare la possibile presenza di fluidi anche nelle fasi luteiniche precoce e media. Nella maggior parte dei casi detta frazione liquida si reperisce in posizione appena distale rispetto alla grande curvatura dell'utero nel punto dove il corno devia caudo-lateralmente. Ciò non ne esclude la possibile presenza anche in altre sedi dell'utero non gravido. Nel diestro si possono, infatti, individuare raccolte di 30-40 mm di lunghezza e 5-10 mm di ampiezza.

Tali raccolte assumono notevole importanza in caso di diagnosi ecografica precoce di gravidanza. La sola presenza di una componente liquida, infatti, non può, costituire un

elemento attendibile di gravidanza, ma, occorrerà focalizzare la nostra attenzione sul riscontro di elementi di certa origine fetale.

Per quanto attiene all'immagine ecografica delle pareti uterine nel corso del proestro, dell'estro e del metaestro possiamo rilevare la presenza di una zona più prossima al lume (adluminale) dotata di una trama tissutale relativamente ipoecogena ed una zona periferica più marcatamente ecogenica. Nel proestro da un terzo a metà delle bovine adulte presenta queste caratteristiche strutturali (parete eterogenea). Nelle altre fasi la parete risulta, invece, generalmente uniforme.

Il fenomeno è ritenuto dipendente dal grado di edema estrogenico presente al calore, a causa del quale la condizione edemigena e secretoria favorisce la bassa ecogenicità adluminale e l'accumulo di liquidi nel lume. Il suddetto meccanismo sarebbe analogo a quanto si verifica nella cavalla, il cui endometrio si edemizza, mentre, il miometrio mantiene caratteri di maggiore ecogenicità ^[42, 64].

2.3.3 REPERTI ECOGRAFICI NEL CORSO DEI PRIMI 90 GIORNI DI GRAVIDANZA

L'UTERO GRAVIDO.- Nel bovino dal 15° giorno in poi la vescicola embrionale assume le sembianze di una struttura filamentosa tubulare, disposta al centro del lume uterino ^[6]. Dal 20° giorno detta struttura può raggiungere la lunghezza di circa 1 metro e si estende dall'estremità craniale di un corno a quella del lato opposto ^[75, 12]. Sino al 25° giorno di gravidanza il diametro trasverso della vescicola allantoidea ed amniotica è ancora talmente sottile da richiedere, per la sua evidenziazione, una sonda ad elevata definizione di almeno 5 MHz. ^[42]. Oltre questa data la quantità di liquidi presenti nella vescicola si accresce rapidamente ed il diametro trasverso subisce una rapida impennata.

10°-20° GIORNO. - Qualora una bovina venisse esaminata giornalmente dal momento dell'inseminazione in poi, il riscontro di una sottile falda liquida si renderebbe evidente tra il 10° ed il 17° giorno nel lume del corno omolaterale al C.L. ^[17]. Nel 75% delle vacche essa sarà presente in forma di piccole aree anecogene tondeggianti di 2-4 mm di diametro ^[64]. In un terzo dei soggetti tali aree appaiono allungate (3-7 mm di lunghezza per 2 mm di diametro). Col trascorrere dei giorni (10°-18° dì) le vescicole tendono ad accrescersi in lunghezza ed a confluire, mantenendo, però, costante il loro diametro. Tra 17° e 20° giorno, (talora anche più precocemente), lungo la vescicola embrionale possono rilevarsi delle sezioni ipoecogene. In molti casi questi piccoli accumuli di liquidi rappresentano sezioni del sacco coriale. Solo attorno al 19° giorno circa a metà della vescicola può comparire una netta area distesa, di solito nel punto del corno dove si era reso visibile l'iniziale accumulo di liquido.

A tale stadio lo studio ecografico della vescicola embrionale appare ancora difficile e poco attendibile. D'altro canto si è visto che una vescicola piena di liquido è rilevabile in alcuni soggetti tra il giorno 11° e 13°, ma non risulta più evidenziabile tra 14° e 17°, nonostante le bovine fossero, poi, effettivamente gravide.

Il diametro massimo della vescicola sino al giorno 20 non supera mai i 3 mm ^[6]; occorre ricordare, al proposito, che il diametro massimo della vescicola embrionale in queste fasi corrisponde proprio al limite inferiore della capacità di risoluzione dello strumento ecografico. Ne consegue che, in base a queste considerazioni, l'indagine ecografica prima del 20° giorno non trova applicazioni diagnostiche di campo, anche se detta tecnica può essere impiegata per scopi di ricerca ^[47].

Ai fini di una eventuale diagnosi differenziale, l'accumulo di liquidi tra 10°- 20° di non può essere differenziato con certezza ed attendibilità dalle immagini ecografiche ottenute al caso di raccolte fluide connesse all'estro, al diestro ed ad alcune condizioni patologiche.

21° - 24° GIORNO. - Raggiunta questa fase evolutiva la presenza di fluidi si è accresciuta al punto da risultare facilmente rilevabile per via ecografica. Il 22° giorno nel punto di massima espansione, di solito corrispondente alla cavità amniotica, la vescicola embrionale raggiunge il diametro di 3-5 mm per una lunghezza di circa 1 cm ^[43]. Detta dilatazione si trova prevalentemente localizzata in posizione distale rispetto alla curvatura del corno, nel tratto libero che si ripiega.

L'embrione p.d. risulterà, comunque, difficilmente evidenziabile prima del 25° giorno e, spesso, risulta difficilmente distinguibile con certezza dalle altre strutture ecogeniche presenti. L'embrione in questi giorni misura circa 5 mm ^[17] e talvolta può già presentare l'itmo cardiaco all'ecografia. La presenza di un C.L. di ridotte dimensioni (< 20 mm) in assenza di liquidi uterini tra 20° e 23° di, depone per una condizione di non-gravidanza ^[47]. La formulazione di una diagnosi positiva si dovrà, invece, basare sul riscontro di strutture riferibili all'embrione ed alla placenta.

A questo stadio gravidico nel contesto del fluido uterino ed in prossimità dell'estremità craniale di un corno può rilevarsi, talora, un accumulo di membrane riferibile verosimilmente allo sviluppo dell'allantoide ^[18]. Detta membrana fluttuante sarà evidenziabile solo per alcuni giorni (23°-26° di), e solo raramente sino al 30° di. Dal 23° giorno, infatti, il sacco allantoideo subisce un rapido accrescimento in lunghezza, che si completerà riempiendo l'intera superficie interna del sacco coriale al 32°-37° giorno.

In questa fase precoce occorre accertarsi con cura che l'accumulo di liquido sia effettivamente intrauterino, differenziandolo, ad esempio, dal lume dei vasi che decorrono alla superficie dell'organo ^[71]. Il riscontro del feto richiede un esame attento di tutto l'organo e spesso richiede diversi minuti.

25° 30° GIORNO DI GRAVIDANZA. - Al 25° giorno la sede di massima espansione della vescicola embrionale raggiunge i 10 mm di diametro e con modesti movimenti rotatori della sonda si potrà seguire il decorso della vescicola nel segmento libero del corno uterino distale. Essa si allungherà sino a penetrare nel corpo uterino per raggiungere il corno controlaterale, dove sarà visibile attorno al 30° giorno, (quando il suo diametro sarà ormai di

circa 18-20 mm nel corno gravido, e di 4-8 mm in quello controlaterale). Sarà, comunque, difficile ottenere una scansione longitudinale completa del corno gravido e più spesso si osserveranno più sezioni del corno e della vescicola. Alcune pliche dell'utero si proietteranno, inoltre, entro il lume inducendo delle costrizioni a carico della vescicola embrionale che apparirà lobulata. In una singola scansione si potranno rilevare da 2 a 3 di queste pliche, che dopo il 30° giorno potranno aumentare di numero raggiungendo le 4-6 pliche per sezione ecografica.

La diagnosi a 25-30 giorni richiede uno strumento ad elevata definizione tanto più che l'ecogenicità dell'embrione è ancora molto prossima a quella dell'endometrio con cui è in stretta aderenza e prossimità. Per tutto il primo mese proprio la stretta prossimità con la parete endometriale ne rende difficile l'identificazione certa. L'embrione, in seguito, sembra staccarsi dalla parete per proiettarsi verso il lume anecogeno e, talora, appare individuabile esclusivamente grazie alla presenza dell'itto cardiaco. Dal 30° giorno l'embrione si distacca finalmente dalla parete per immergersi nel fluido anecogeno. Talora il piano di scansione deve essere modificato lentamente per distinguere il feto da artefatti connessi a fenomeni di riflessione che producono echi molto intensi in grado di mascherarlo. Dal 25° al 30° giorno l'embrione passa da 5 a 12 mm di lunghezza e l'itto cardiaco, che si presenta con contrazioni ritmiche talora percepibili sin dal 20° giorno, diviene progressivamente più evidente.

Con una sonda da 5 MHz. la diagnosi di gravidanza dovrebbe essere perfettibile dal 25° giorno in poi, sulla base della presenza di fluidi e di strutture riferibili al feto o alle sue membrane. Con sonde da 3 - 3,5 MHz. la diagnosi transrettale dovrà essere procrastinata di almeno 5 giorni (prove di accuratezza con apparecchiature a frequenza più contenuta consentono di eseguire una diagnosi sicuramente positiva solo dal 45° giorno ed una negativa dal 35-40°).

31° - 40° GIORNO DI GRAVIDANZA. - Attorno al 30° giorno la lunghezza dell'embrione (dalla testa alla groppa - CRL) raggiunge i 12 mm, che divengono 15 mm al 35°, e 20 mm attorno al 40° ^[64]. La vescicola amniotica si rende evidente tra 30° e 35° giorno, essa circonda l'embrione a distanza di pochi mm dando origine ad una linea iperecogena che circonda l'embrione.

Attorno al 40° giorno il diametro della vescicola amniotica è di circa 2,5 cm e racchiude un embrione di 2 cm di lunghezza totale. All'esame ecografico, però, tali

dimensioni possono variare in funzione del piano stesso di scansione o per movimenti intestinali del feto o per contrazione delle pareti uterine che possono modificarne i diametri.

Tra i 30 e i 40 giorni iniziano a rendersi evidenti anche i placentomi, che prendono la forma di piccole protrusioni dalla parete verso il lume, inizialmente più evidenti nelle aree più prossime all'embrione.

41° - 90° GIORNO DI GRAVIDANZA. - L'embrione nell'intervallo compreso dal suo primo riscontro (20-30° giorno) al 50° si allunga di circa 1 mm/dì: al 35° ad esempio esso sarà lungo circa 35 mm. Parallelamente diverrà sempre più facilmente apprezzabile la vescicola placentare, che a 40 giorni sarà pari a 25 mm, al 50° raggiungerà i 35-40 mm ed al 70° i 60 mm ^[43, 18]. La sede di maggior ampiezza del corno sarà comunque, sempre in corrispondenza del sacco amniotico e del feto, mentre, le dimensioni del corno controlaterale saranno decisamente più contenute.

Ai 40 giorni si potranno evidenziare distintamente strutture embrionali e fetali tra cui l'itto cardiaco a dimostrazione della vitalità dell'embrione. L'embrione assume sempre più le sembianze di una struttura differenziata costituita di varie parti somatiche (testa, arti, corpo, cordone ombelicale) ^[75] e saranno anche evidenziabili i primi nuclei di ossificazione scheletrica.

Nel corso del secondo mese l'aspetto dilatato e segmentato del lume appare particolarmente accentuato. Le pliche dell'endometrio si spingono nel lume suddividendolo in numerosi scomparti, ed una sezione sagittale completa del corno gravido avvolto su se stesso può fornire una immagine formata da tanti lobi triangolari con base sulla grande curvatura e apice verso la piccola curvatura (abbastanza simile ai raggi di una ruota di carro). Successivamente i setti si retraggono progressivamente per aumento della frazione liquida ed al 70° giorno la divisione in lobuli risulterà meno evidente. Ricordiamoci che una sonda da 5 MHz. lunga in media 5 cm può fornire una immagine di 9 cm di profondità in grado di comprendere tutto l'embrione (lungo appunto circa 5 cm attorno al 50° giorno). Dal momento che al 60° giorno l'embrione sarà più lungo della sonda esso sarà più difficilmente evidenziabile per tutta la sua lunghezza. Con una sonda a frequenza più bassa il feto nel suo insieme sarà ancora completamente evidenziabile sino a 90 giorni.

OLTRE QUESTE DATE saranno sempre più facilmente reperibili strutture placentari e loro dettagli, ma almeno nel bovino viene meno l'interesse per la diagnosi di gravidanza.

L'ecografia oltre a questa data potrà, comunque, rappresentare ancora un mezzo per seguire il decorso della gravidanza e verificare la vitalità del feto. A questo scopo, in gravidanza molto avanzata, quando, il feto risulterà difficilmente raggiungibile per via transrettale, si potrà ricorrere alla scansione ecografica transcutanea.

2.3.4 INDIVIDUAZIONE ECOGRAFICA DEL SESSO DEL FETO.

Anche se esula dalle strette finalità del presente lavoro che mira essenzialmente al semplice riscontro della condizione gravidica, ci pare opportuno ricordare che a partire dal 50°-60° giorno in condizioni di scansione ecografica particolarmente favorevole si potrà rilevare, sia pur con un certo margine d'errore, anche il genere del feto grazie all'evidenziazione degli abbozzi mammari nella femmina o dello scroto e del tubercolo genitale nel maschio. Quest'ultimo, a forma bilobata ed ovoidale, attorno al 55° giorno si ritrova, infatti, spostato verso l'ombelico dove darà origine al pene ed al prepuzio nel soggetto di genere maschile, mentre, persisterà sia pur con minor sviluppo a livello perineale nella femmina (vulva e clitoride). Mammelle e scroto saranno più facilmente differenziabili in fasi più avanzate, ma comunque entro il 120° giorno. In ogni caso, non sempre al singolo esame sarà facile individuare questi caratteri con certezza, ed in molti casi saranno richieste più visite anche di conferma^[70].

Rilievi ecografici e clinici di gravidanza nella bovina.

Giorni di gravidanza		Ø uterino	Ø vescicola embrionale	CRL	Rilievi ecografici	Rilievi clinici	Note
10°/20°					Leggero lume	Utero in cavità pelvica addominale	D.d.: raccolta uterina; calore
21°/ 24°			3-5 mm 10 mm		allantoide	Utero in cavità pelvica addominale	D.d.: raccolta uterina; vasi
25°/30°			≈10 mm	8-12 mm	Itto cardiaco	Utero in cavità pelvica addominale	D.d.: raccolta uterina
31°/ 41°	30°	20-40 mm corno	≈18mm	8-12 mm	Vescicola lobulate, pliche uterine riconosciment o appendici	No palpazione feto per la notevole turgidità dell'amnios	Vesc. amn. circonda l'embrione e lo evidenzia
	35°	controlat.: 4-8mm	≈20 mm	8-12 mm			
	40°	40-60 mm	≈25 mm	12-22 mm	Parti somatiche		
50°		50-60 mm		≈35 mm	embrione/feto	Succussione, doppia parete	Possibile sessaggio fetale
60°		60-90 mm	60-75 mm	60-80 mm	Placentomi, parti anatomiche	Succussione, doppia parete	
75°/80°		9-13 cm		8.5-11 cm	Placentomi Ø 0.5-1 cm, parti fetali	Utero debordante dal pube, feto palpabile	
90° (3° mese)		12-16 cm		13-17 cm	Placentomi Ø 1/1.5 cm, parti fetali	Corno gravido può essere retratto, placentomi palpabili	

2.4 ENDOMETRITE E PIOMETRA :REPERTI CLINICI ED ECOGRAFICI.

Dal momento che le patologie uterine, con speciale riferimento alle forme produttive (caratterizzate da accumulo di materiali secretori in ambito intraluminale), possono rappresentare uno dei principali aspetti che impongono una diagnosi differenziale dalla condizione gravidica o dalle raccolte fluide fisiologicamente reperibili in alcune fasi del ciclo, abbiamo ritenuto opportuno in questa sede svolgere una breve trattazione bibliografica anche di questa problematica.

Il processo noto come metrite sfugge ancora ad una definizione semeiologica chiara, univoca ed accettata da tutti, con l'eccezione delle forme più acute e gravi, anche se si conoscono bene i danni economici e produttivi che, anche le forme più lievi, sono in grado di esercitare nei nostri allevamenti ^[76].

Storicamente, al termine “metrite” differenti autori hanno associato concetti differenti, che vanno da patologie dell'utero di gravità elevata e con riflessi sistemici, a fenomeni iniziali d'infezione appena manifesta o sub-clinica, ma, comunque, in grado di evolvere in forme più gravi o a cronicizzarsi, pregiudicando, almeno temporaneamente l'attività ciclica ovarica e la capacità riproduttiva del soggetto.

Una prima importante considerazione consiste nel fatto che le bovine da latte, a causa di fattori produttivi, ambientali e gestionali sono affette da queste patologie con una incidenza molto più elevata rispetto a quelle da carne, allevate in un contesto molto più confacente.

Oggigiorno, infatti, grazie anche al sempre più stretto monitoraggio clinico ed ecografico cui sono sottoposti gli animali in produzione intensiva (al fine rilevarne e correggerne tempestivamente ogni eventuale anomalia puerperale utero-ovarica, in modo da favorire un tempestivo recupero della funzione riproduttiva), si è osservato che una percentuale superiore al 90% delle bovine nell'immediato post-partum subisce fenomeni di inquinamento settico delle vie genitali e che nei soggetti “sani” questi processi vengono posti sotto controllo e spenti entro le prime quattro settimane dal parto ^[41].

Nelle vacche da latte dati bibliografici segnalano un'incidenza di fatti metritici in una percentuale oscillante tra 8 e 24% delle lattazioni. La comparsa di endometriti clinicamente rilevabili tra le 2-5 settimane dal parto può, talora, assumere anche un andamento enzootico, giungendo negli allevamenti di grandi dimensioni ad interessare il 40% delle bovine ^[16].

In una recente indagine su 8152 bovine, visitate entro il 21° giorno dal parto, si è riscontrata la presenza di metriti nel 21,9% dei casi (con oscillazioni dal 2,4 al 38,6% in funzione dell'allevamento considerato), di cui il 16% era rappresentato da soggetti esenti da trascorsi anamnestici di distocia e/o di ritenzione placentare, cui sono in genere attribuite le più frequenti cause di infezioni settiche uterine ^[51].

In base a questi dati si può, quindi, comprendere facilmente come l'endometrite puerperale possa di fatto rappresentare una delle principali cause di sub-fertilità nelle vacche da latte, tanto più che l'incidenza di questa patologia si ritiene di fatto sottostimata, sia a causa dell'assenza di riflessi sistemici concomitanti, sia a causa del fatto che in molti casi il fenomeno tende comunque, ad estinguersi spontaneamente con il susseguirsi periodico dell'attività ciclica ovarica, non senza interferire, però, negativamente sull'intervallo parto/nuova gravidanza ^[59].

Dal punto di vista batteriologico nelle prime 4 settimane post-partum (7°-14°-21°-28° dì) la presenza di batteri in utero è stata riscontrata rispettivamente nel 93% - 94% - 87% e 81% delle puerpere. Mentre l'intensità dell'accrescimento batterico (BDG) per i patogeni uterini è risultata progressivamente più elevata, in funzione delle caratteristiche macroscopiche del materiale di scolo vaginale: a) muco-purulento, b) purulento puro, e, c) purulento associato ad odore fetido.

Sul piano patogenetico si ritiene che lo sviluppo di batteri patogeni, rilevato da recettori immunitari presenti nelle cellule endometriali, stimoli una reazione infiammatoria, che suscita, in via primaria, l'endometrite e, secondariamente, influisce negativamente sull'attività follicolare ovarica. Negli animali con accrescimento batterico più marcato, infatti, anche il follicolo dominante tende a svilupparsi più lentamente ed il picco di estrogeni è più contenuto, verosimilmente a seguito di un'inibizione delle cellule della granulosa, correlata ai mediatori del processo infiammatorio (del tipo TNF- α) ^[68].

D'altra parte, appare anche comprovato che il riscontro di tassi di progesterone elevati a 3 settimane di puerperio (verosimilmente correlabile alla deiscenza del primo follicolo dominante) sia espressione di una condizione di “*salubrità*” dell'utero, di una potenzialità di accoppiamento più precoce, di un concepimento più tempestivo, ed, infine, di una possibilità più elevata di gravidanza ^[30].

Sulla scorta di questi riscontri A.A. hanno, recentemente, proposto di definire **endometrite clinica**: la presenza di una patologia infiammatoria dell'utero, caratterizzata da scolo purulento utero-vaginale almeno 21 giorni dopo il parto o da scolo muco-purulento oltre i 26 giorni dal parto stesso.

Attualmente la diagnosi si basa sul rilievo di:

- a) anomalie degli scoli vulvari
- b) reperti palpatori ed ecografici transrettali specifici
- c) reperti colposcopici, associati a materiali di scolo presenti in vagina
- d) quadri di citologia endometriale compatibili con un processo infiammatorio
- e) esiti di indagini microbiologiche comprovanti la presenza di microrganismi patogeni
- f) reperti istopatologici da biopsia uterina dimostrativi del danno locale ^[59].

Sebbene ai fini di una diagnosi precoce e certa di endometrite sia richiesta, comunque e sempre, la convergenza di più elementi clinici o laboratoristici, desumibili dai vari esami collaterali, un rilievo sempre più marcato stanno assumendo i riscontri ottenibili dall'indagine ecografica, ad integrazione della visita clinica, che andremo qui di seguito ad esporre e discutere:

ENDOMETRITE. - La presenza di fluidi in ambito uterino può essere indicativa di endometrite cronica, anche se tale accumulo può variare sensibilmente dal punto di vista sia qualitativo, sia quantitativo. In molti casi la raccolta di fluidi può essere segmentaria, ma, nei casi di endometrite grave entrambe le corna risultano sensibilmente distese, con diametro di parecchi centimetri, mentre, nelle forme più lievi il lume può addirittura non essere ecograficamente rilevabile. La presenza di fluidi non costituisce, pertanto, un elemento di certezza diagnostica dal momento che, come abbiamo già sottolineato, una componente fluida caratterizza, talora, anche la semplice fase estrale del ciclo e, in forma costante, la condizione gravidica ^[45].

A differenza dell'anecogenicità netta dei fluidi fisiologici ^[65], quelli patologici, di natura infiammatoria, sono caratterizzati da un aspetto flocculare ^[26]. In altri termini, saranno presenti fiocchi ecogenici biancastri in sospensione nella frazione liquida meno ecogena, che producono un effetto "nevicata", specialmente quando, a causa delle manovre sull'utero, vengano a crearsi delle turbolenze nel contesto del fluido intraluminale.

Ad ogni buon conto, in assenza di altri elementi di natura clinica, ai fini dell'emissione della diagnosi di endometrite i soli dati ecografici vanno giudicati con una certa cautela. A meno che l'endometrite non si accompagni ad un accumulo sensibile di fluidi in situ, l'esame ecografico non sarà in grado di evidenziare le modificazioni patologiche indotte a carico dell'endometrio. Solo in presenza di tale distensione, infatti, il dato ecografico potrà assumere un certo significato diagnostico ^[45].

Fenomeni degni di nota sono stati rilevati anche a seguito di trattamenti terapeutici intrauterini. Al caso di irrigazioni con soluzioni iodate al 4%, ad esempio, la superficie del lume endometriale si rende prontamente iperecogena e tale rimane per un certo periodo, anche dopo il deflusso dei liquidi iniettati.

PIOMETRA. - La forma più accentuata ed evidente di endometrite definita “piometra” è caratterizzata dal punto di vista ultrasonografico da un utero sovradisteso da un’importante presenza di fluidi, contenenti piccoli ammassi flocculari uniformemente dispersi. L’ecogenicità di questi fluidi dipende in buona parte dalla loro consistenza e densità: se la secrezione risulta molto densa o “spessa” e contiene molti elementi cellulari, l’ecogenicità può raggiungere quella delle pareti uterine, mentre, un contenuto meno denso e più fluido risulterà molto più scuro delle pareti uterine che lo delimitano.

Nei casi di piometra lo spessore delle pareti, varia sensibilmente da caso a caso. Solamente quando le pareti risultino molto ispessite tale elemento potrà essere sfruttato per differenziare una condizione di piometra da una di gravidanza. Una diagnosi di piometra sulla sola base ecotomografica richiede, pertanto, una certa cautela in quanto anche in gravidanza avanzata l’utero appare disteso e la componente fluida può risultare dotata di un certo grado di ecogenicità. In tali frangenti la diagnosi differenziale richiede un attento esame di tutto il lume uterino alla ricerca di elementi e strutture riferibili a strutture placentari o fetali.

Un quadro analogo a quello della piometra (con molti frustali in sospensione) si può rilevare anche a seguito di un’interruzione precoce di gravidanza con degenerazione dell’embrione e dei suoi annessi, i cui residui possono, talora, rimanere in utero per parecchie settimane, in presenza di un corpo luteo ancora funzionale. Tali osservazioni sono in accordo con quelle ottenute a seguito dell’induzione di mortalità embrionale senza regressione del corpo luteo ^[55].

CONSIDERAZIONI CLINICO DIAGNOSTICHE. - Un’anomala interpretazione degli scoli vaginali nella fase puerperale potrebbe portare ad una sopravvalutazione di queste patologie. Per quanto concerne i materiali di scolo (da marrone, a rosso a biancastri), che caratterizzano la metrite, è soprattutto importante l’esalazione di un intenso odore fetido.

Spessore e atonia delle pareti uterine (assenza di rughe longitudinali oltre i 15 giorni dal parto) e alterazioni delle dimensioni e della consistenza cervicale sono da annoverarsi tra gli eventi rilevabili alla palpazione, analogamente alla percezione di un lume all’interno delle corna uterine. La palpazione da sola non è comunque un metodo

sufficiente per una diagnosi accurata e specifica di endometrite, perlomeno in assenza di un supporto batteriologico comprovante la presenza di germi aerobi e, in particolare, anaerobi.

Una colposcopia, che tenga anche conto dell'aspetto e delle secrezioni presenti sull'ostio cervicale esterno, pur richiedendo la disponibilità di strumenti sterili e di un procedimento rispettoso delle principali norme di asepsi, potrebbe apportare ulteriori importanti elementi diagnostici relativi allo stadio evolutivo del processo metritico.

L'endoscopia, che teoricamente potrebbe fornire un quadro diretto della condizione interna dell'organo (mucosa uterina), risulta molto difficilmente realizzabile in questa specie, mentre, per quanto attiene la biopsia delle pareti uterine, se da un lato ci può permettere un'analisi istopatologica dettagliata del quadro morbosus in atto, dall'altro essa può risultare foriera di successive complicazioni, rischiando di incidere negativamente sulla ripresa della capacità riproduttiva del paziente ^[25].

La persistenza oltre i 28 giorni di una flora batterica locale, associata al riscontro di falde liquide e di modificazioni della struttura, del tono e della consistenza delle pareti uterine sarebbero, quindi, da considerarsi elementi riferibili, perlomeno, ad un'involuzione non corretta o intempestiva e all'avvio di un processo infiammatorio, magari non ancora eclatante, ma destinato, spesso, a sfociare in alterazioni delle secrezioni uterine e cervicali al momento dell'*eventuale* ripresa dell'attività ovarica ciclica.

Naturalmente le capacità di recupero spontaneo dall'aggressione batterica dell'utero sono dipendenti dalle condizioni generali del soggetto, dall'entità della fase catabolica puerperale, dalla gravità dello stress subito al parto, dall'integrità delle vie genitali, dalla funzionalità degli organi emuntori e del sistema immunitario e, soprattutto, dal tempo necessario per una *restitutio* della fertilità (che normalmente richiede la ripetizione di più cicli estrali).

2.5 MORTALITA' EMBRIONALE PRECOCE.

L'ultimo importante capitolo che abbiamo preso in considerazione ai fini della definizione dell'attendibilità della diagnostica ecografica di gravidanza è quello relativo agli episodi di interruzione di gravidanza, che spesso si verificano nel primo trimestre, talora con decorso subdolo, associato a semplice riassorbimento del prodotto del concepimento, talaltra con esito in aborto esterno conclamato. Qualora tali eventi sopravvengano in tempi successivi ad una diagnosi precoce e decorrano inosservati, essi potrebbero inficiare l'attendibilità della nostra diagnosi, ponendoci di fronte a soggetti, già accertati gravidi, che riprendono inaspettatamente a ciclare.

Sul piano teorico, grazie ai meccanismi sincronizzativi naturali ed in assenza di fattori endogeni ed esogeni in grado di interferire negativamente sulla libido e sulla fertilità dei partner, il tasso di fertilizzazione degli oociti ovulati naturalmente dovrebbe essere molto prossimo al 100%.

Una quota non indifferente di questi embrioni sono, però, persi nel corso della gestazione. L'incidenza di tali perdite è molto elevata nella fase differenziativa (prime 3-4 settimane), per declinare poi lentamente nel corso del primo terzo della gravidanza, tendendo infine, ad assestarsi nella fase embrionale propriamente detta.

Nelle vacche da latte si stima che, ad un tasso di fertilizzazione (percentuale di fertilizzazione su 100 oociti) prossimo al 90% corrisponda un tasso effettivo di parti molto più contenuto (parti/100 oociti) pari a circa il 50%. Risulta, quindi, facile comprendere come le perdite totali in termini di gravidanze si possano stimare prossime al 40%.

Di questi episodi di mortalità embrionale il 75-80% circa si realizza in fasi molto precoci, sicuramente precedenti alla diagnosi di gravidanza, (in altri termini entro il 20° giorno dal concepimento).

In stadio molto precoce (giorni 1°-15° circa), infatti, la sopravvivenza dell'embrione dipende esclusivamente dall'ambiente e dalle secrezioni materne, non potendo esso stesso interferire in alcun modo con la madre. Solamente dopo il riconoscimento materno di gravidanza (connesso nei bovini alla produzione embrionale di interferone- τ) potrà avviarsi tra embrione e madre una sorta di dialogo biochimico ed endocrino bilaterale e reciproco. Le perdite di embrioni in questo stadio molto delicato sono, quindi, addebitabili essenzialmente all'ambiente genitale della gestante e/o a gravi difetti del corredo genetico dell'embrione.

In particolare, si considera che dal giorno 0 al 42° sia coinvolta l'attivazione di un gran numero di geni (noti e meno noti), che portano alla sintesi di mediatori chimici responsabili dei processi differenziativi e dei sistemi di comunicazione endocrina materno-fetale (citochine, lattogeni placentari, ormoni e fattori di crescita quali: GH, somatomedine etc...) ^[33].

Dal punto di vista pratico, gli episodi di mortalità embrionale più precoci sfuggono ad un riscontro clinico, essendo destinati al riassorbimento locale, seguito dal semplice riscontro di un ritorno in estro in data regolare (se la perdita avviene entro il 15-16° giorno) o, in data irregolare (quando l'evento sopraggiunga più tardivamente) rispetto a quella prevedibile in base al ciclo precedente. Solamente gli episodi che si instaurano in fase fetale avanzata comporteranno una condizione di aborto esterno clinicamente rilevabile.

In tempi relativamente recenti, grazie all'incremento della precocità della diagnosi di gravidanza ecografica, sono apparsi in bibliografia numerosi articoli relativi all'incidenza degli episodi di mortalità embrionale tardiva o fetale precoce, comunque, sempre successivi alla diagnosi condotta attorno al 38° giorno.

L'applicazione delle tecniche ecografiche, infatti, se da un lato permette un sensibile anticipo dell'accertamento clinico di gravidanza, dall'altro ha messo in evidenza come in una percentuale relativamente contenuta, ma pur sempre significativa di casi (dell'ordine del 9-11% ^[55]), all'accertamento precoce positivo faccia, talora, seguito un'interruzione della gravidanza, con conseguente negativizzazione della diagnosi ai controlli successivi o con un inatteso ritorno in calore della femmina già *classificata* gravida.

Mentre, i casi (rari nella nostra casistica) di diagnosi apparentemente negative in fase precoce e positive al secondo esame più tardivo, si possono ragionevolmente ricondurre ad un'incertezza diagnostica, ad un'eccessiva precocità dell'indagine, o, ad un limite tecnico dello strumento (in altri termini ad un possibile errore umano o tecnico), la negativizzazione di una diagnosi certamente positiva potrebbe suscitare perplessità e dubbi su un'eventuale compromissione della gravidanza ad opera delle stesse manovre ecografiche eseguite nel corso del primo esame.

Dal momento, inoltre, che anche nella nostra esperienza personale siamo incappati in alcuni soggetti sicuramente gravidi al primo esame, risultati poi negativi in epoca più avanzata, riteniamo opportuno in questa sede dedicare un capitolo alla mortalità embrionale avanzata o fetale precoce, al fine di inquadrare anche dal punto bibliografico le problematiche connesse a questi eventi. Particolarmente interessante ci è parso, al

proposito, un lavoro di López-Gatius et al. (2002) che riporta un'analisi approfondita dei fattori che possono correlarsi alle interruzioni di gravidanza che si instaurano tra 38° e 90° giorno di gestazione nella vacca da latte ed a cui faremo spesso riferimento.

Nelle bovine da latte ad elevata produzione, in queste ultime decadi si è registrato un progressivo declino dell'efficienza riproduttiva ^[8, 27]. L'incremento della produzione di latte, infatti, si è associato ad un concomitante aumento dell'incidenza dei disordini riproduttivi, che a loro volta, hanno contribuito ad una riduzione della fertilità ^[66]. In questi frangenti l'attenzione viene, in genere, primariamente focalizzata sull'efficienza nel riscontro dei calori e sull'efficacia della inseminazione. Tuttavia la principale fonte di perdite economiche in queste circostanze sembrerebbe imputabile prevalentemente a fenomeni di interruzione precoce della gravidanza.

Nella bovina la fase embrionale della gestazione si estende dal concepimento alla fine dello stadio differenziativo (42° giorno circa), mentre, la fase fetale comprende l'intervallo tra il 42° giorno ed il parto ^[14]. Anche se appare accertato che la maggior parte delle interruzioni di gravidanza si realizzi nel corso della fase embrionale precoce ^[39, 73], il rischio di perdite fetali sembra, tuttavia, accrescersi in funzione dell'intensivazione delle produzioni e dei sistemi aziendali di gestione ^[28]. Tant'è che i fenomeni di mortalità fetale al caso di gravidanze già diagnosticate positive possono raggiungere e superare la soglia del 12% ^[19, 58].

Negli allevamenti intensivi i programmi di controllo della riproduzione prevedono l'esecuzione della diagnosi clinica (palpazione transrettale) di gravidanza già poco oltre il 30° giorno (diagnosi precoce).

Le gravidanze che si interrompono, quindi, tra questa prima diagnosi ed il 90° giorno spesso sono destinate a sfuggire al riscontro da parte del clinico. Ad oggi le informazioni relative ai fattori che possono alterare lo sviluppo dell'embrione e del feto sono ancora scarse e si ritiene che le interruzioni di gravidanza in questo lasso di tempo possano essere di natura polifattoriale ^[73]. Ciononostante l'influenza di fattori, materni ed esogeni, necessita di essere chiaramente distinta da quelli connessi alla qualità degli embrioni stessi ^[35]. In alcune indagini al proposito ^[52, 54] sono stati presi in considerazione gli effetti dei fattori manageriali e dei disordini riproduttivi pre-concepimento sulle interruzioni di gravidanza successive alla diagnosi stessa. Dette indagini hanno posto in evidenza come i tassi di interruzione gravidica fossero più elevati nei soggetti che avevano superato o una ritenzione placentare, o un'infezione uterina, rispetto alle vacche con puerperio normale. Anche la stagione ed alcuni aspetti di carattere generale legati alla

singola mandria sono risultati significativi. L'intervallo parto-concepimento, l'ordine di lattazione, ed i trascorsi di repeat-breeding non sembrano, invece, rivestire alcuna correlazione con l'interruzione tra i 38 ed i 90 giorni. López-Gatius et al. (2002) hanno anche cercato di stabilire se queste interruzioni potessero essere correlate ad altri fattori quali: precedenti sincronizzazioni farmacologiche dei cicli, numero di corpi lutei e di embrioni presenti al momento della diagnosi; alterazioni del body score; produzione quantitativa di latte; patologie intercorrenti, e cause genetiche (toro utilizzato per le inseminazioni).

Le indagini riportate da questi Autori sono state svolte in un unico allevamento (400 vacche in produzione) a conduzione intensiva, assoggettato ad un rigido protocollo di gestione della riproduzione, in modo da evitare eventuali effetti sulle perdite embrionali, dipendenti da variazioni gestionali e/o genetiche tra differenti aziende e armenti.

In particolare, tutti i soggetti erano sottoposti ad ecografia transrettale a 38-44 giorni dal potenziale concepimento, seguita da conferma clinica manuale tra 90° e 96° giorno.

Analogamente a quanto emerso, almeno parzialmente, in precedenti indagini, anche dai dati statistici pubblicati da López-Gatius (2002) non è stata rilevata alcuna correlazione diretta tra mortalità embrionale e:

a) produzione latte, b) ordine di lattazione, c) numero di giorni in lattazione al momento del concepimento, d) trattamenti di induzione degli estri (prostaglandine), e) numero di inseminazioni, f) patologie intercorrenti, g) body score condition al parto precedente ed al momento della relativa diagnosi, e h) stagione dell'evento abortigeno.

Interferenze reciproche di segno negativo sono state evidenziate, invece tra rischio di interruzione gravidica e: 1) la presenza di portate gemellari, 2) un rapido declino del body score nei primi trenta giorni di puerperio, 3) l'impiego di materiale seminale di alcuni tori addetti all'I.A.; mentre, interconnessioni di tipo positivo sono state rilevate con la presenza di corpi lutei supplementari.

Complesse correlazioni sono state, infine, poste in evidenza tra l'impiego di prostaglandine, l'incidenza di ovulazioni multiple, il conseguente incremento di gravidanze gemellari e l'accresciuta incidenza dei tassi di mortalità embrionale.

PERDITE EMBRIONALI E GEMELLARITA' - Che le gravidanze gemellari nella specie bovina rappresentassero un evento indesiderato e foriero di perdite economiche è già stato associato da tempo ^[23], ma, si riteneva che le perdite principali fossero addebitabili alla minor vitalità dei neonati, alle interruzioni tardive della gravidanza e all'incidenza delle distocie al parto, tutti fenomeni essenzialmente riconducibili ad una ridotta disponibilità di spazio nell'ambito uterino ^[73, 19].

I dati dell'indagine di López-Gatius (2002) dimostrano, invece, che perdite, forse ancor più sensibili, si registrano in fasi gravidiche precoci, a causa del rischio abortigeno ad esse intrinsecamente connesso. Scendendo nel dettaglio su 601 bovine diagnosticate gravide al primo esame, 489 (81,3%) sono risultate portatrici di un singolo embrione, mentre, ben 112 (18%) presentavano una gravidanza gemellare. A dimostrazione del rapporto tra queste due categorie di soggetti e l'incidenza epidemiologica degli episodi di mortalità embrionale successivi alla diagnosi ecografica al 38° dì, basti pensare che sul totale di 64 bovine affette da interruzione gravidica, 40 (pari al 8,2%) appartenevano alla categoria delle gravidanze singole, mentre, ben 24 episodi (pari al 21,4%) erano riferibili a soggetti con gravidanza gemellare. In conclusione, da questi dati traspare che le vacche portatrici di gravidanza gemellare presenterebbero un rischio di interruzione 3,1 volte superiore rispetto ai soggetti portatori di un unico feto.

Non dimentichiamo che negli ultimi 20 anni l'incremento della gemellarità è stato correlato anche all'incremento della produzione latte ^[50, 61]. Nelle BLAP, infatti, il tasso di ovulazioni doppie supera il 20% ^[29] ed il tasso di gemellarità al parto può superare il 9% ^[50]. L'incidenza complessiva delle ovulazioni multiple nel lavoro di López-Gatius (2002) si aggira addirittura sul 26,8%, valore che si discosta, comunque, sensibilmente dai tassi del 13,1% ^[48] e del 14,1% ^[29] riportati in indagini in cui il tasso di ovulazione è stato determinato dopo l'inseminazione. Una giustificazione di queste discrepanze così elevate potrebbe però essere riferita al fatto che la popolazione da studiata da López-Gatius (2002) era costituita da sole vacche gravide a seguito di I.A. senza tener conto di quelle in cui alla doppia ovulazione non ha fatto seguito il concepimento. Pertanto i dati riportati potrebbero indicare un tasso più elevato di gravidanza conseguente ad ovulazioni multiple, tanto più che i dati di quest'ultimo autore sono in accordo con quelli di un'altra precedente indagine ^[5].

López-Gatius (2002) non ha rilevato effetti significativi sulle perdite embrionali, riferibili a trattamenti per la sincronizzazione degli estri; la valutazione di questa variabile appare, però, molto complessa. Un'alterazione significativa tra l'impiego di prostaglandine

prima del concepimento ed il rischio di gemellarità (rapporto di probabilità di 1,19) è stato, invece, segnalato in un'indagine relativa a 52.326 lattazioni ^[50]. Nonostante l'esiguità della casistica di López-Gatius (2002) limiti la possibilità di riscontro di differenze significative, i dati sembrano, tuttavia, confermare il fatto che le prostaglandine tendano ad accrescere il rischio di ovulazioni multiple e conseguentemente di gravidanze gemellari. Nei soggetti che hanno concepito al calore sincronizzato, rispetto a quelle gravide a seguito di un calore spontaneo, si è osservata, infatti, un'incidenza più elevata di corpi lutei addizionali (11,5 % vs 7,7 %) ed un numero più elevato di gravidanze gemellari (20,2 % vs 17,5 %). E' anche possibile che l'incremento del rischio di interruzione gravidica nelle vacche sincronizzate, concomitante all'aumento del tasso di gravidanze gemellari, possa essere mascherato dal parallelo incremento dei soggetti portatori di un corpo luteo addizionale. In pratica, l'incremento delle ovulazioni doppie aumenterebbe, da un lato, la quota di gravidanze gemellari (a maggior rischio), e dall'altro il tasso di gravidanze singole con corpi lutei supplementari (a minor rischio di interruzione). In conclusione, dal momento che nei prossimi anni ci si attende un'ulteriore incidenza del fenomeno delle ovulazioni doppie, A.A. preconizzano addirittura, interventi di riduzione fetale, analogamente a quanto avviene in ostetricia ippiatrica ^[46, 57, 56].

PERDITE EMBRIONALI E ALTERAZIONI DEL BODY SCORE CONDITION.

– Premesso che la valutazione del BSC costituisce un mezzo di valutazione dello stato nutrizionale delle bovine da latte ^[38], *numerose indagini hanno evidenziato una correlazione lineare tra intensità del calo del BSC nella fase puerperale e successiva fertilità* ^[22, 69].

L'indagine di López-Gatius (2002) è la prima che definisca una correlazione diretta tra riduzione del BSC ed interruzione di gravidanza, anche a prescindere da patologie intercorrenti clinicamente rilevabili. Secondo López-Gatius, infatti, *le vacche che abbiano, comunque, subito un calo di almeno una unità nel punteggio del body score tra l'ultimo parto ed il 30° giorno di puerperio, presentano un rischio 2,4 volte più elevato di interruzione gravidica*, indipendentemente dal valore assoluto assegnato a questo parametro. E' risaputo che nelle primissime fasi di lattazione la vacca affronta un bilancio energetico negativo ^[8], che verrà tamponato o compensato solo in lattazione più avanzata. Le conseguenze di questo calo metabolico iniziale appaiono, tuttavia, difficili da valutare in quanto correlate a innumerevoli altre variabili, oltre ai semplici fattori nutrizionali.

Alcuni Ricercatori, al calo della fertilità nelle bovine in lattazione ^[8, 66], hanno associato l'incremento della produzione latte. Dal lavoro di López-Gatius tale

correlazione non risulterebbe confermata, anche in considerazione del fatto che le produzioni nelle sue condizioni operative oscillavano tra 15 e 64 kg e l'intervallo medio parto-concepimento era prossimo ai 142 giorni. Durante questi 4,5 mesi il susseguirsi di più cicli estrali prima della nuova gravidanza ed il ripristino di un bilancio energetico positivo da parte di molti soggetti può aver ridotto gli effetti negativi sulle funzioni riproduttive delle richieste metaboliche imposte dalla lattazione iniziale.

Un calo eccessivo del BSC è stato spesso addebitato a patologie metaboliche o infettive intercorrenti o subcliniche ^[40, 67], ma, nella citata indagine, grazie anche allo stretto controllo sanitario cui sono stati sottoposti gli animali nei primi 30-40 giorni successivi al parto ed al momento dell'I.A., non è stato possibile rilevare la presenza turbe riproduttive intercorrenti. *Si è pertanto ipotizzato che una scadente condizione nutrizionale post-partum possa interferire, comunque, con l'involuzione dell'utero, favorendo l'arresto della gravidanza successiva nello stadio fetale, in concomitanza con lo sviluppo dei placentomi* ^[18].

Dai dati di López-Gatius le vacche incappate in patologie di carattere clinico manifesto hanno presentato lo stesso tasso di interruzione gravidica rispetto ai soggetti sani. I processi infiammatori connessi alle mastiti ed alle zoppicature possono elevare la produzione di prostaglandine favorendo la lisi del CL gravidico ^[36]. La somministrazione a questi soggetti di antinfiammatori non steroidei, inibitori la sintesi prostaglandinica (flunixin meglumine o Finadine) ^[49], potrebbe aver tamponato questo effetto negativo sul corpo luteo nella casistica in esame.

AmMESSO che le condizioni nutrizionali siano dipendenti dalla strategia di alimentazione, López-Gatius (2002), a titolo profilattico, suggerisce il raggruppamento di tutti i soggetti in fase puerperale, al fine di prevenire o limitare l'insorgenza di eventuali insufficienze nutrizionali, riducendo gli effetti negativi di un calo eccessivamente rapido delle condizioni nutrizionali (BSC) nelle puerpere.

EFFETTO DEL SEME SULL'INTERRUZIONE GRAVIDICA. Sempre nello stesso lavoro è stato posto in evidenza come le vacche inseminate con il seme di un particolare toro avessero corso un rischio di aborto precoce 3,4 volte più elevato rispetto alle altre bovine. Analoghi riscontri erano già stati segnalati da A.A. ^[58] in un'indagine concernente oltre 58 000 gravidanze. Oltre a fenomeni di natura genetica endogeni al toro, López-Gatius (2002) ha sospettato anche l'eventualità (non altrimenti dimostrata) di possibili infezioni connesse a contaminazione del materiale seminale di quel particolare

soggetto. Per quanto attiene ai tori utilizzati, in alcune circostanze possono essere presenti fattori negativi, ma, questo aspetto richiede ancora ulteriori chiarimenti e conferme.

2.6 CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE SULLO STUDIO PROPEDEUTICO

La trattazione teorica sin qui condotta si è proposta non solo di fornire un quadro il più possibile puntuale ed aggiornato sul ruolo dell'ecografia nell'ambito della diagnostica ostetrico-ginecologica della bovina, ma anche e soprattutto di esporre in forma organica i principali riscontri e le problematiche correlate all'applicazione della tecnica ecografia per via trans-rettale, prima di addentrarci nella sperimentazione di una via d'approccio alternativa di tipo transvaginale.

Nonostante per ovvi motivi di natura essenzialmente economici e per difficoltà tecnico applicative di campo la tecnica ecografica classica stia ancora riscuotendo un successo relativamente limitato, essa appare ormai destinata ad un'ampia e rapida diffusione almeno nei comparti produttivi tecnologicamente più avanzati, con particolare riferimento al settore specializzato nella produzione del latte. Nel complesso, infatti, appare chiaro come l'approccio ecografico possa integrarsi vantaggiosamente con l'attività del clinico, migliorando l'attendibilità che la precocità sia delle indagini volte ad una precisa e precoce identificazione dei differenti momenti funzionali fisiologici dell'apparato genitale (ciclo e condizione gravidica), sia di quelle finalizzate al riscontro ed alla definizione di quadri clinico-patologici della sfera genitale.

All'innegabile efficacia diagnostica della scansione ecografica fanno però ancora riscontro alcune difficoltà di ordine pratico-applicativo derivanti dalle esigenze di miniaturizzazione della strumentazione, di miglioramento della resistenza meccanica e della protezione igienica dell'unità informatica, e, infine, di ottimizzazione delle condizioni ambientali di illuminazione non sempre consone all'impiego dello strumento in campo.

3. STUDIO SPERIMENTALE

“ESPERIENZE APPLICATIVE DELL’ECOGRAFIA TRANS-VAGINALE AI FINI DIAGNOSTICI DI GRAVIDANZA NELLA BOVINA PRESSO IL CENTRO INTERDIPARTIMENTALE “E. AVANZI” DELL’UNIVERSITA’ DEGLI STUDI DI PISA”

3.1 INTRODUZIONE.

Le metodologie d’approccio ecografico in campo ostetrico e ginecologico si sono, nel tempo, diversificate in funzione delle caratteristiche anatomo-topografiche dell’apparato genitale delle singole specie e delle peculiarità tecniche delle sonde disponibili^[45]. In tale ottica l’approccio trans-rettale è stato adottato essenzialmente nelle specie di grande mole a complemento della tradizionale palpazione clinica, mentre, la via trans-addominale è stata riservata alle specie in cui le altre *finestre acustiche* apparivano particolarmente indaginose ed un *taxis* diretto sugli organi genitali interni era ostacolato dalle ridotte dimensioni somatiche^[11, 24].

Nel settore veterinario prevale, quindi, l’applicazione trans-rettale, con sonde lineari da 5-7 MHz. (cavalla, bovina)^[9, 18], o trans-addominale, con sonde da 3-3,5 MHz. ad elevata capacità di penetrazione (pecora, capra e scrofa)^[11, 34, 7]. In queste ultime due specie è stato anche proposto da alcuni autori l’accesso trans-rettale semplice sfruttando sonde umane di tipo “prostatico”, ma, con successo applicativo, relativamente scarso a causa dei rischi di ingiurie intestinali iatrogene, in assenza di un adeguato contenimento dell’animale.

In ambito umano lo sviluppo dell’ultrasonografia endo-vaginale ha, invece, completamente rivoluzionato le possibilità diagnostiche in ambito sia ginecologico sia ostetrico. La via trans-addominale è stata pressoché abbandonata, la finestra pre-pubica, rappresentata dalla vescica ripiena, non è risultata più essenziale, dal momento che la stretta contiguità della vagina con l’apparato genitale interno ha permesso di ottenere dettagli molto più incisivi e precoci soprattutto con sonde a frequenza variabile ed in particolare nel corso delle prime fasi gravidiche^[15, 37, 72].

Nella cavalla una possibile applicazione della via trans-vaginale è stata sinora intravista solo per la riduzione del numero di feti nel caso di gemellarità, per l'esecuzione della quale è stato allestito un strumento lungo circa 80 cm, dotato di una impugnatura, alla cui estremità distale è posizionata una sonda ecografica su cui scorre un canale di servizio per l'ago aspirante ^[45, 56].

In ambito buiatico specifico, invece, la via d'accesso trans-vaginale all'apparato genitale è stata limitata quasi esclusivamente a pratiche relativamente sofisticate di natura ginecologica: Ovum Pick-Up, amniocentesi, e, in via sperimentale, per prelievi o di liquidi placentari o di fluidi follicolari ^[60, 53, 63].

In particolare ci piace sottolineare che, non abbiamo sinora ritrovato alcuna segnalazione d'impiego a fini diagnostici di gravidanza in data antecedente le nostre prime esperienze nella pecora ^[2] e nella bovina ^[1].

L'utilizzo della diagnostica ecografica per via trans-vaginale nella bovina è, stata descritta, quasi contemporaneamente anche da Chastant-Maillard S. et al. (2004) per lo studio particolareggiato delle ovaie, ad integrazione dei reperti palpatori, in modo da meglio guidare il clinico nella scelta della terapia più appropriata. La principale motivazione del ricorso a tale pratica era dettata dall'osservazione che l'individuazione dei corpi lutei (CL) alla semplice palpazione trans-rettale è individualmente molto variabile (70%>88%), con una specificità tra il 50% e l'82% anche se praticata da clinici esperti. A sostegno di queste osservazioni è stato evidenziato che molto spesso la mancata percezione di tali strutture è dovuta o ad un marcato sviluppo del CL nel contesto dello stroma ovarico associato ad una procidenza ed un colletto quasi assente (falsi negativi), o, in alternativa, ad limitato trofismo del corpo luteo stesso (falsi positivi). Per quanto riguarda la strumentazione l'autore consigliava una sonda convex da 7MHz., di dimensioni contenute, alloggiata in un lungo manicotto, ed opportunamente protetta e lubrificata, posizionata a livello del fornice dorsale della cervice, molto prossimo alle ovaie. ^[13].

Più recentemente altri autori, hanno descritto, invece, l'utilizzo dell'ecografia trans-vaginale a scopo diagnostico di gravidanza nell'alpaca previa sedazione (7gg-65gg post-accoppiamento). In queste condizioni operative gli autori riferiscono di un'accuratezza diagnostica buona già al 24° dì (evidenziazione dell'itto cardiaco) ed una differenziazione delle porzioni embrio/fetali a partire dal 45°, preconizzando l'utilizzo di tale tecnica per la diagnosi ecografica precoce e per la valutazione dell'accrescimento fetale ^[10].

Nella specie bovina l'ultrasonografia trans-rettale, ormai insostituibile in ginecologia ippiatrica, non ha, d'altro canto, ancora trovato altrettanta diffusione, e non solo per i costi connessi alla strumentazione, bensì, anche per le innegabili difficoltà pratico applicative connesse al differente management aziendale, cui sono sottoposti questi animali. In condizioni ottimali il soggetto da sottoporre ad ecografia dovrebbe essere, infatti, enucleato dal gruppo, isolato in un travaglio, posizionato in prossimità di una fonte, in modo da favorire una certa igiene della manovre esplorative ed a protezione delle apparecchiature dai possibili insulti meccanici. Precauzioni tutte difficilmente applicabili in azienda dal momento che richiedono anche un notevole impegno di personale che viene distratto da altre attività, rappresentando un costo aggiuntivo non indifferente. Non dimentichiamo, inoltre, che la bovina è caratterizzata spesso anche da un continuo stato di ripienezza dell'alvo contenente quasi sempre feci di consistenza poltacea e/o semiliquida che possono ridurre la qualità delle scansioni, interponendosi tra la superficie della sonda e le pareti rettali. Dal punto di vista tecnico, poi, la diversa conformazione anatomica e spaziale dell'utero, del sacco coriale e delle ovaie nella bovina rende anche meno agevole il posizionamento trans-rettale della sonda ecografica in corrispondenza della porzione apicale del corno gravido, e richiederebbe preferibilmente una sonda con connessione a T del cavo in modo da poterla disporre più facilmente in posizione trasversa nell'ambito del retto ^[1,3].

Per ottimizzare il lavoro diagnostico in azienda idealmente sarebbe opportuno disporre di sonde maneggevoli, prive magari di cavi ed in grado di trasmettere via radio le informazioni ad un schermo miniaturizzato. Al proposito bisogna riconoscere che alcuni sforzi in tal senso sono già stati eseguiti (apparecchi miniaturizzati) e saranno certamente perfezionati nel tempo.

Alla luce di questo stato di cose, con la presente tesi abbiamo cercato di verificare l'applicabilità della diagnosi ecografica di gravidanza per via, trans-vaginale, con la recondita speranza di ottenere delle scansioni uterine più chiare ed immediate, in assenza dell'interposizione del materiale fecale, ed, al tempo stesso, operando in condizioni igieniche migliori per l'operatore e per il paziente.

L'interesse per questa via, alternativa a quella trans-addominale classica, ci è derivato sia dalle tecniche di suzione eco-guidata dei follicoli attualmente impiegate in buiatria (Ovum Pick-Up con sonde ad elevata frequenza), sia dalle correnti applicazioni ostetrico-ginecologiche nella specie umana ^[60, 53, 63].

La nostra attenzione è stata, in particolare, focalizzata nella verifica della praticabilità sistematica di tale tecnica di scansione uterina valutandone pregi, difetti, limiti temporali d'applicazione, attendibilità e, non ultime, la semplicità e la rapidità d'esecuzione nei differenti momenti evolutivi compresi nei primi 50-60 giorni di gravidanza.

Dal momento, poi, che in diverse circostanze ci siamo imbattuti in negativizzazioni tardive di diagnosi sicuramente positive in fasi più precoci, abbiamo preso anche in considerazione il fenomeno della mortalità embrionale, la cui incidenza è stata comprovata e quantificata anche nella nostra casistica. Non dimentichiamo che il momento in cui viene normalmente richiesto ed eseguito l'esame diagnostico palpatorio di gravidanza (attorno al 40° giorno) risulta, infatti, ancora particolarmente critico, delicato e, potenzialmente, persino foriero di rischi di aborto iatrogeno, soprattutto al caso di manualità improprie o troppo traumatiche. La visualizzazione ecografica dell'utero e dei suoi contenuti, oltre a una formulazione più precisa della diagnosi, risulta, infatti, sicuramente meno traumatica e praticamente innocua rispetto alla diagnosi manuale (non richiedendo particolari manovre sull'organo) oltre a risultare anche altamente dimostrativa in campo didattico permettendo ai principianti di confrontare mentalmente i reperti palpatori con quelli visivi forniti dalla scansione dell'organo ^[1, 3].

3.2 MATERIALI E METODI:

Le indagini diagnostiche sono state condotte presso l'azienda zootecnica del Centro Interdipartimentale "E. Avanzi" dell'Università degli Studi di Pisa (S. Piero a Grado), nel contesto dell'attività routinaria di assistenza clinica e didattica prestata dal settore Ostetrico-Ginecologico della nostra Facoltà nel periodo 2004-2006.

3.2.1 Casistica:

Lo studio è stato effettuato su 150 vacche primipare e pluripare di razza Frisone Italiana allevata in purezza regolarmente iscritte al Libro Genealogico, vaccinate ed esenti da malattie trasmissibili quali Tubercolosi e Brucellosi. Nonostante le condizioni anatomico-topografiche teoricamente più favorevoli gli accertamenti diagnostici sulle manze sono stati numericamente molto contenuti, causa del differente tipo di stabulazione e gestione aziendale per questa categoria di animali.

Il sistema di allevamento è di tipo semi-libero, mentre l'alimentazione è condotta con sistema Unifeed a base di insilato di mais, paglia, fieno, prodotti direttamente in

azienda, e di concentrati, acquistati da ditte mangimistiche accreditate. Acqua e sali minerali sono disponibili *ad libitum*. La dieta viene stabilita secondo buone pratiche di allevamento della bovina da latte ad alta produzione.

Per quanto riguarda la gestione riproduttiva della mandria il segnalamento dei calori è basato essenzialmente sull'osservazione diretta da parte degli operatori (mungitori) ed è coadiuvato da un sistema di rilevazione automatica bi-giornaliero (contestuale alla mungitura), tramite pedometro (h: 05:00 del mattino e alle 16:30 del pomeriggio). Ciascun soggetto viene inseminato secondo i piani di accoppiamento aziendali al 1° calore spontaneo utile, tra i 60-100 giorni dal parto, in base allo stato generale del soggetto e previa visita clinica dell'apparato riproduttivo. L'intervento fecondativo (I.A.) viene effettuato solitamente a 12 ore dal rilievo del calore ed il giorno dell'I.A. viene inteso come Giorno 0 per il nostro studio.

Ogni soggetto, che non avesse manifestato segni evidenti di ritorno in calore per almeno 24 giorni post-I.A. veniva inserito nel programma di studio e diagnosticato. Tutti i soggetti positivi al primo esame erano, successivamente, ricontrollati per conferma al raggiungimento dei 45-70 giorni di *presunta* gravidanza. Tale *range* di conferma, inizialmente più ristretto, è stato, poi, volutamente ampliato in maniera da comprendere e rilevare eventuali perdite embrionali, spontanee, o, almeno in via ipotetica, in qualche modo connesse alla prima diagnosi.

I soggetti diagnosticati positivi in base al riscontro di scansioni riferibili ad una gravidanza in atto, venivano successivamente tenuti sotto osservazione da parte del personale tecnico (per eventuali ritorni di calore) fino al momento della seconda ecografia di conferma. Le bovine risultate negative al riscontro strumentale venivano, invece, reinseminate al caso di ritorno spontaneo alla data prevista di calore, o, in assenza di ripresa dell'attività ciclica spontanea, riesaminate più tardivamente, prima, comunque, di intraprendere qualsiasi misura terapeutica finalizzata a ristabilirne la ciclicità (prostaglandine, irrigazioni uterine etc. ...).

Per l'esame ecografico, subito dopo le operazioni di prelievo del latte, le bovine venivano contenute in un appositi spazi, adiacenti alla sala di mungitura, dotati di auto-catture e con disponibilità di alimento ed acqua (per ridurre lo stress delle pratiche).

3.2.2 Strumentazione:

Le esperienze di ecografia trans-vaginale sono state condotte con un ecografo ESAOTE, modello Falco, Pie Medical Equipment B.V., Maastricht, Paesi Bassi, dotato di

una sonda convessa a frequenza variabile (5-7,5 MHz.), non intra-cavitaria, ma, in grado di fornire un'adeguata profondità di campo esplorativo (>12 cm a 5 MHz.).

Prima dell'introduzione in vagina, la sonda (di dimensioni pari a 12x2x4cm, dotata di cavo a T e di una fonte convessa di 3 cm circa, con fascio di ultrasuoni divergente diretto nel senso del suo asse maggiore), era protetta e montata su un adeguato supporto artigianale, che ne permettesse la guida manuale anche nei settori vaginali più profondi e prossimi al fornice vaginale.

L'allestimento di tale "*prolunga*" è stato eseguito artigianalmente, deformando al calore ed adattando alla sonda l'estremità distale di un comune tubo in PVC di 4 cm di diametro, alla cui estremità prossimale era, invece, applicata un'impugnatura "*a pistola*". Per l'inserimento della sonda e per il passaggio del filo di alimentazione il supporto tubolare è stato aperto longitudinalmente.

La sonda prima di essere innestata su tale supporto era, inoltre, protetta con un semplice profilattico, contenente alcuni ml. di gel per ecografia, e l'intero strumento, una volta assemblato, era rivestito con un guanto *monouso* da esplorazione rettale opportunamente lubrificato con gel per ecografia in modo da garantire un elevato standard di sicurezza sanitaria al passaggio da un soggetto all'altro.

3.2.3 Modalità operative.

Il procedimento operativo applicato consisteva dapprima nella detersione della regione perineale dei pazienti con sapone iodato (Betadine chirurgico) e nella lubrificazione della rima e del vestibolo vulvari con gel ecografico.

Si posizionava, quindi, sulla commessura vulvare inferiore, il manipolo, che veniva, poi, spinto delicatamente in avanti dapprima in direzione cranio-dorsale e successivamente in direzione cranio-ventrale, seguendo il lume della vagina, senza rischio di incontrare la plica del meato uretrale. L'estremità prossimale, fornita di impugnatura, era portata leggermente in alto verso la commessura dorsale, in modo da mantenere il supporto inclinato verso il basso e da dirigere teoricamente la sonda al di sotto del fornice cervicale, verso il cavo vescico-genitale in stretta prossimità con la parte convoluta delle corna uterine ^[1, 3].

Le manovre sin qui descritte escludevano, evidentemente l'interposizione al davanti della sonda di feci o di altri visceri – con l'eccezione, naturalmente, della parete vaginale, dell'utero e/o di porzioni di vescica – evitando, al tempo stesso, quelle difficili e delicate manovre di inversione del corno gravido, quasi sempre indispensabili all'atto di una

diagnosi clinica precoce con modalità esclusivamente manuali ^[1, 3]. Non dimentichiamo, al proposito, che l'indagine ecografica condotta per qualsivoglia via, richiede solo minime manualità a carico dell'utero, risultando, proprio per questo, meno rischiosa di quella classica, manuale trans-rettale.

Posizionato il *transducer* nella sede descritta si procedeva alla scansione del territorio antistante allo stesso mediante delicati movimenti di lateralità e di rotazione del supporto (e conseguentemente della sonda) sul proprio asse longitudinale (rotazione di 90° su entrambi i lati).

Al caso di gravidanza in atto, la positività diagnostica era prontamente dimostrata dal rinvenimento di quadri uterini facilmente riferibili ad una dilatazione del lume uterino prodotta dalla presenza di un contenuto liquido anecogeno, associato a strutture ecogeniche riferibili agli annessi placentari e/o al feto.

Le manualità appena descritte sono quelle relative al tipo di scansione che noi abbiamo definito “*trans-vaginale semplice*”, in contrapposizione alla scansione “*trans-vaginale bimanuale*” o “*retto-vaginale*” cui abbiamo costantemente fatto ricorso al caso di diagnosi negativa o dubbia. In queste circostanze, infatti, il mancato reperimento di quadri uterini gravidici, in assenza di riscontri tattili di sorta dell'organo, ci hanno costantemente indotti all'integrazione dell'esame, con un ulteriore accertamento di conferma bimanuale, eseguito per via trans-rettale, consistente nel sollevamento manuale dell'utero e/o delle ovaie in modo da portarlo con sicurezza in fronte allo strumento ecografico stesso, in questo caso disposto al di sopra del fornice cervicale (vedi figura 1).

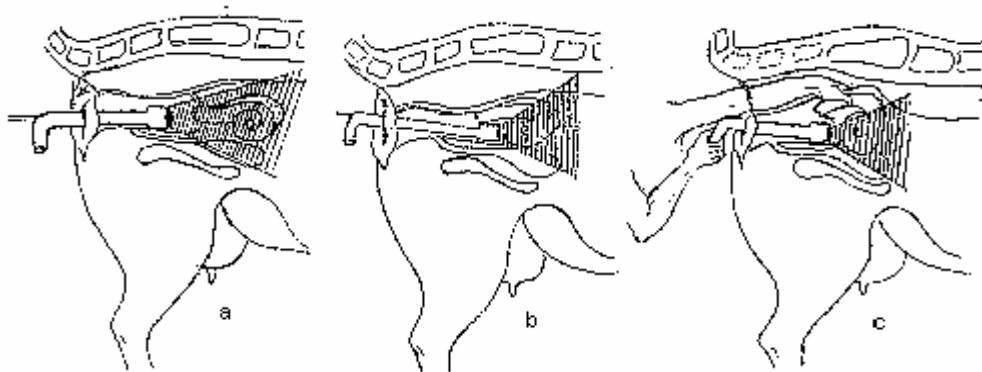


Figura 1: a = Ecografia trans-vaginale semplice o superficiale; b = Ecografia trans-vaginale profonda sotto il fornice vaginale; c = Ecografia bimanuale o rettovaginale (sollevamento della cervice).

3.3 OSSERVAZIONI ED ACCORGIMENTI TECNICO APPLICATIVI.

Prima di accingerci ad un'applicazione sistematica del metodo, in via preliminare, abbiamo verificato che le bovine tollerassero di buon grado l'introduzione graduale dello strumento nelle vie genitali, alla quale hanno dimostrato di rispondere in maniera non molto dissimile da quella conseguente all'introduzione di uno speculo (inarcamento del dorso con eventuale defecazione e/o minzione). D'altro canto le dimensioni della sonda ecografica a disposizione (12x2x4 cm) erano sicuramente ben compatibili con quelle della vagina di una vacca adulta. Più renitenti alla visita si sono dimostrate ovviamente le manze, sia per il lume ridotto delle vie vaginali, sia per la loro ancora scarsa attitudine alle visite ginecologiche. In 4 delle 5 manze testate, immediatamente prima dell'esame abbiamo, inoltre, dovuto procedere alla lacerazione manuale delle briglie imenali, con conseguente limitato spandimento emorragico locale.

Successivamente abbiamo proceduto ad una serie di scansioni trans-vaginali eseguite in bovine già diagnosticate gravide per via trans-rettale classica, in quanto in questa specie avevamo già una sufficiente esperienza di ecografia diagnostica ed avremmo, pertanto, potuto agevolmente comparare i risultati delle due metodiche.

In ordine di tempo, abbiamo dovuto, poi, selezionare anche la frequenza ultrasonografica ottimale per questo tipo di applicazione, tenendo conto della tipologia delle sonde a nostra disposizione (ed in assenza di una sonda settoriale) e della profondità del campo da esplorare. Partendo dal presupposto che in medicina umana vengono utilizzate sonde a frequenza variabile (in genere tra 5 e 7 MHz.) abbiamo stabilito di iniziare con la frequenza di 5 MHz.. In considerazione anche della disposizione topografica degli organi da esaminare (l'utero vuoto e quello gravidico almeno nelle prime fasi di gravidanza e nei soggetti giovani si ritrova abbastanza allineato con la vagina e, quindi, in posizione craniale, o, al massimo, cranio-ventrale rispetto alla cervice) tale frequenza ci avrebbe, infatti, permesso di spingere la scansione sino ad almeno 12-14 cm di profondità, mantenendo elevato il livello qualitativo delle immagini ^[1, 2, 3,].

Nelle nostre condizioni operative la frequenza di 5MHz. ci è sembrata ottimale soprattutto per la profondità di campo molto più ampia, mentre l'impiego dei 7,5MHz. non ha fornito riscontri altrettanto validi ai semplici fini diagnostici, anche se resta, comunque, da verificarne l'efficacia per l'eventuale approfondimento dei dettagli, una volta perfezionata la prima diagnosi. In particolare, il passaggio dall'una all'altra frequenza in

corso d'esame ci è parso, almeno per ora, troppo indaginoso ed abbiamo, quindi, scelto di rimandarlo eventualmente a prossime fasi applicative.

Le prime effettive verifiche di campo sono state ancora un volta condotte su soggetti già diagnosticati gravidi attorno al 30-40° giorno, e proprio in questi soggetti, con nostra sorpresa, abbiamo verificato che, in presenza di un alvo libero da feci, l'utero gravido era spesso già evidenziabile alla semplice intromissione della sonda ai confini del vestibolo con la vagina propriamente detta (a livello dell'anello o costrizione imenale) (fig. 2).

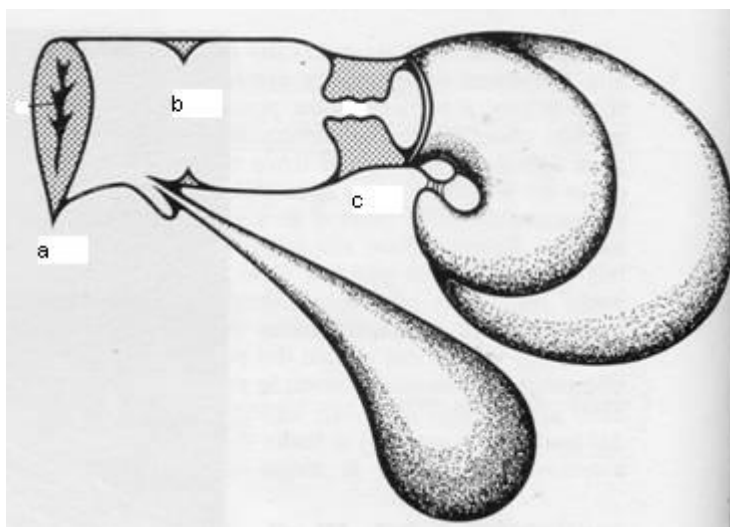


Figura 2: Rappresentazione schematica degli istmi anatomici delle vie genito-urinarie: a = vulva; b = anello imeneale; c = cervice.

In particolare, abbiamo verificato che a livello di detta costrizione anulare imenale, naturalmente presente in questa sede, le pareti vaginali si comportavano come un fronte unico dinnanzi alla sorgente di ultrasuoni. Purtroppo, in presenza di feci nell'alvo rettale, questo fenomeno non è sempre presente, e, non siamo stati in grado di ritrovare un riflesso alla defecazione, costantemente evocabile prima dell'esame ecografico. In presenza di ristagno fecale nell'ampolla, gli ultrasuoni, pertanto, non potranno spingersi in profondità e la sonda, per risultare operativa, dovrà essere introdotta sino al fornice vaginale.

Inoltre, proprio nei casi di replezione del retto, lo stimolo meccanico conseguente alla penetrazione vaginale dello strumento tenderà, quasi a dispetto, a provocare la defecazione in corso d'esame, che potrà essere facilmente scansata spostando lateralmente il manipolo senza peraltro pregiudicare il risultato o l'igienicità delle manovre.

L'introduzione della sonda andrà, in ogni caso, eseguita lentamente cercando, al tempo stesso, di evitare l'ingresso di aria, che espandendo la vagina, potrebbe rendere più difficoltoso l'esame profondo.

Nei soggetti gravidi tra 30° e 40° giorno, prescelti per le prime prove i riscontri trans-vaginali permettevano di evidenziare rapidamente la condizione gravidica grazie alla presenza di molteplici sezioni uterine anecogene, circolari e più spesso ovalari ed ellittiche, talora confluenti, e con un aspetto di continuità durante i movimenti di lateralità e/o rotazione della sonda nei differenti piani di osservazione. Le sezioni dell'utero in questa fase variavano tra i 2 ed i 6 cm e procedendo ad una scansione dettagliata si potevano già reperire con una certa facilità sezioni riferibili alla vescicola embrionale e all'embrione stesso.

Acquisita una certa dimestichezza operativa ed una buona conoscenza dei quadri ecografici ottenibili a questo stadio gravidico, abbiamo proceduto ad applicare il metodo anche a soggetti notoriamente non gravidi in modo da confrontarne gli aspetti ecografici.

Positivamente impressionati dalla buona corrispondenza tra diagnosi per via trans-rettale e per via trans-vaginale, abbiamo, infine, deciso di invertire il procedimento e ad anticipare progressivamente la precocità delle diagnosi applicando dapprima la tecnica trans-vaginale e poi quella trans-rettale di conferma su soggetti di cui non era nota effettiva condizione gravidica o meno. Ad ogni buon conto, pur avventurandoci in diagnosi, talora, anche molto precoci (24° dì), per non alterare la normale routine gestionale computerizzata dell'attività riproduttiva in queste prime fasi operative abbiamo ritenuto di considerare comunque "ufficialmente" gravidi per l'azienda solo i soggetti riscontrati positivi oltre il 30° giorno di gravidanza.

In alcune circostanze, ci siamo, però, accorti che l'evidenziazione dell'utero era, talora, resa difficile dalla presenza di corna uterine iperplasiche ed ipertrofiche, correlabili verosimilmente a stadi avanzati della carriera riproduttiva (numero di parti elevato) o ad esiti di eventi patologici uterini di natura cronica (metriti, repeating breeders...).

A questa categoria appartenevano prevalentemente soggetti non gravidi con uteri debordanti dal pettine del pube verso la cavità addominale, ma, in alcuni casi, soprattutto in fasi relativamente precoci di gravidanza, la diagnostica trans-vaginale semplice non risultava attendibile, fornendoci riscontri falsamente negativi.

Per questo motivo in tutti i soggetti apparentemente negativi al solo approccio trans-vaginale semplice abbiamo escogitato il ricorso al contestuale sollevamento manuale dell'utero per via trans-rettale, vuoi retraindo ed elevando la cervice verso l'alto con la mano sinistra, vuoi elevando talora le porzioni distali delle corna agendo sulle singole ovaie (esame trans-vaginale bimanuale). L'applicazione di questo accorgimento ci ha

anche permesso, a questo punto, di tralasciare il confronto con il metodo trans-rettale classico con la sonda nel lume uterino (vedi fig. 1.c) ^[1, 3].

Con il metodo bimanuale, inoltre, l'attendibilità delle diagnosi negative migliorava, infatti, sensibilmente, escludendo i falsi negativi e rientrando in parametri accettabili (vedi risultati e discussione).

Le condizioni di parziale ripienezza della vescica, in qualche caso hanno fornito immagini in grado di ingenerare elementi di confusione che sono stato, però, rapidamente dissipati modificando il piano e la profondità di scansione. In alcuni soggetti non gravidi, l'esame trans-vaginale ha permesso, anche, l'evidenziazione di patologie cistiche dell'ovaio (facilmente differenziabili in base alla tipologia delle pareti), che sono state confermate successivamente con la metodica bi-manuale a 7MHz. (vedi fig. 1.c) e sottoposte a terapia farmacologia.

Anche se per ora è occorsa alla nostra attenzione un solo caso di raccolta uterina patologica correlata ad un episodio di riassorbimento embrionale, abbiamo motivo di ritenere che la densità dei liquidi ricchi di flocculazioni e le caratteristiche strutturali delle pareti uterine dovrebbero, comunque, permetterne un'agevole la diagnosi differenziale.

3.4 RISULTATI.

I risultati, relativi alle diagnosi effettuate e confermate sulle 150 bovine oggetto di questa tesi (vedi tabelle allegate alla tesi) sono stati elaborati suddividendoli nei seguenti 4 gruppi:

a) diagnosi positive = soggetti positivi alla trans-vaginale semplice, alla bimanuale ed alle diagnosi successive di conferma;

b) falsi positivi = soggetti positivi alla trans-vaginale semplice, ma, negativi alla bimanuale ed alle diagnosi successive (non gravidi);

c) diagnosi negative = soggetti negativi alla trans-vaginale semplice, alla bimanuale ed alle diagnosi successive;

d) falsi negativi = soggetti negativi alla trans-vaginale semplice, ma, positivi alla bimanuale e alle diagnosi successive (gravidi).

Tabella 1: Disposizione dei gruppi

a	b	a + b
c	d	c+d
a + c	b + d	TOT

Nel nostro studio sono stati esaminati **150** soggetti di cui **99** effettivamente “gravidì” e **51** “vuoti”.

Dei **99** soggetti gravidì:

- **86** sono risultati **effettivamente positivi** già alla diagnosi TV semplice (**a**) confermata nella stessa seduta dalla bimanuale e alla visita di controllo più tardiva;

- **13** sono risultati, invece, **falsi negativi** (**d**) cioè apparentemente negativi alla TV semplice, ma, positivi alla tecnica bimanuale e alla diagnosi di controllo (vedi tabella).

Dei **51** soggetti diagnosticati non gravidì:

- **49** soggetti sono risultati **effettivamente negativi** alla diagnosi TV (**c**) confermata nella stessa seduta dalla bimanuale e al controllo successivo (vedi tabella).

- **2** soggetti sono risultati, invece **falsi positivi** in quanto erroneamente diagnosticati gravidì alla TV semplice (**b**), ma non alla bimanuale ed a quella di controllo più tardiva.

Sulla scorta dei dati appena esposti sono state calcolate:

1) la Sensibilità del metodo = la capacità di identificare correttamente i soggetti gravidì alla prima scansione TV semplice, rispetto ai successivi accertamenti di conferma.

$$[(a/a+d)*100] = Se (\%)$$

2) La Specificità = la capacità di corretta identificazione dei soggetti non gravidì alla prima scansione TV semplice, rispetto ai successivi accertamenti di conferma.

$$[(c/c+b)*100] = Sp (\%)$$

3) Il Valore Predittivo Positivo (VPP): la probabilità che la prima diagnosi TV positiva risulti confermata dai successivi esami di accertamento.

$$[(a/a+b)*100] = VPP (\%)$$

4) Il Valore Predittivo Negativo (VPN): la probabilità che la prima diagnosi TV negativa risulti confermata dai successivi esami di accertamento.

$$[(c/c+d)*100]= \text{VPN (\%)}$$

Tabella 2: Sinopsi dei risultati alla TV semplice

a = 86	b = 02	88
c = 49	d = 13	62
135	15	150

Da tali calcoli si evince che la tecnica **trans-vaginale semplice** presenta:

- Una sensibilità pari al $[(86/86+13)*100]$ = **86 %**.
- Una specificità pari al $[(49/49+ 2)*100]$ = **96 %**.
- Un Valore predittivo Positivo pari al $[(86/86+ 2)*100]$ = **97 %**.
- Un Valore Predittivo Negativo pari a $[(49/49+13)*100]$ = **79 %**.

Tabella 3: Sinopsi dei risultati alla TV Bimanuale

a = 98	b = 02	100
c = 49	d = 01	50
147	03	150

Mentre quella **trans-vaginale bimanuale** si associa a:

- Una sensibilità pari al $[(98/98+1)*100]$ = **98 %**.
- Una specificità pari al $[(49/49+2)*100]$ = **96 %**.
- Un Valore predittivo Positivo pari al $[(98/98+2)*100]$ = **98 %**.
- Un Valore Predittivo Negativo pari a $[(49/49+1)*100]$ = **98 %**.

Al fine poi di individuare **l'intervallo di massima efficienza ed attendibilità** diagnostica della nostra tecnica abbiamo suddiviso la nostra casistica in 3 fasce di soggetti:

- quelli sottoposti a diagnosi nell'intervallo compreso tra 24° e 30° giorno dall'I.A. (82 casi);
- quelli sottoposti a diagnosi nell'intervallo compreso tra 31° e 37° giorno dall'I.A. (40 casi);
- quelli sottoposti a diagnosi oltre il 30° giorno dall'I.A. (28 casi).

Per ciascun gruppo, utilizzando le stesse formule precedentemente illustrate, abbiamo quindi ri-calcolato i differenti parametri che sono riportati nella seguente tabella:

Sinopsi dei risultati delle tre categorie.

	24°/30°dì	31°/37°dì	> 38°dì
Sensibilità	81%	93%	94%
Specificità	92%	100%	100%
Valore Predittivo Positivo	96%	100%	100%
Valore Predittivo Negativo	72%	86%	86%

4. ANALISI E DISCUSSIONE.

Analisi della casistica

Come abbiamo già evidenziato dei **99** soggetti gravidi, **86** sono risultati positivi già alla diagnosi TV semplice e confermati tali nella stessa seduta dalla scansione TV bimanuale, mentre, **13** sono risultati falsi negativi, cioè apparentemente negativi alla TV semplice, ma, positivi alla tecnica bimanuale ed alla diagnosi di controllo.

Dall'analisi particolareggiata delle cartelle cliniche di questi 13 falsi negativi è stato evidenziato che:

- 8 vacche presentavano un utero debordante in cavità addominale, infatti, alla semplice retrazione dell'utero in cavità pelvica risultavano chiari segni ecografici di gravidanza;
- 1 soggetto all'apparente diagnosi negativa TV, col il semplice svuotamento del retto è risultato anch'esso gravido e riconfermato tale ancora al 39° dì;
- 1 soggetto risultava affetto da pneumovagina, che determinava un mancato collabimento delle pareti sulla sonda con conseguente assenza di immagini sullo schermo. Inconveniente risolto semplicemente con l'introduzione della mano libera nel retto in modo da determinarne la fuoriuscita dell'aria e la conseguente visualizzazioni delle parti anatomiche interessate;
- 2 soggetti alla diagnosi precoce effettuata rispettivamente al 28° e 24° giorno post-I.A., presentavano una ridotta quantità di liquidi gestazionali; situazione gravidica confermata al successivo controllo clinico al 50° dì per il primo soggetto, e clinico ecografico al 31° per il secondo;
- 1 soggetto, in gravidanza precoce (27°dì), era stato diagnosticato vuoto per errore umano nell'interpretazione dell'ecogramma sia TV semplice che TV bimanuale, ma, era risultato effettivamente gravido alla visita di conferma al 50°. Questo caso si può considerare l'unico vero errore o, comunque, il più grave in quanto commesso anche all'atto della conferma TV bimanuale.

Per quanto attiene l'incidenza relativamente elevata di casi falsi negativi all'esame trans-vaginale semplice abbiamo modo di ritenere che il fenomeno sia stato addebitabile, non solo alla fase di gravidanza più o meno precoce, ma, anche a condizioni di ripienezza

dell'alvo, che tende ad occupare spazio verso il basso disturbando l'esame, e/o a condizioni di ipertrofia delle corna uterine, che, debordando dal pettine del pube, erano dislocate verso la cavità addominale.

Probabilmente non è neppure un "caso" che su 13 soggetti che hanno presentato tale problema 8 fossero, di fatto, dei "*repeating breeder*", caratterizzati da scarsa fertilità (da 4 a 7 I.A. prima della diagnosi), da protratte fasi di lattazione pre-concepimento, e, da un certo grado di ipertrofia uterina, verosimilmente riconducibile a trascorsi di metriti o di processi involutivi incompleti. Ad ogni buon conto, abbiamo più volte verificato che un semplice svuotamento dell'ampolla rettale seguita dalla ripetizione anche solo dell'esame trans-vaginale semplice, migliora già di per sé la qualità delle immagini e l'efficacia delle scansioni. Abbiamo anche motivo di ritenere che, soprattutto nelle prime fasi, anche la relativamente scarsa esperienza applicativa del metodo possa aver concorso ad accrescere detta percentuale di falsa positività.

Dei **51** soggetti non gravidi, invece, **49** vacche sono risultate negative alla prima diagnosi e sono state successivamente confermate vuote e trattate di conseguenza. I restanti **2** soggetti (vacche 230 e 280 della tabella allegata) sono risultati, invece, falsi positivi, dal momento che sono stati erroneamente diagnosticati gravidi alla TV semplice a causa della erronea interpretazione di immagini riferibili a cavità anecogene che alla contestuale diagnosi bimanuale risultavano, invece, attribuibili, in un caso, ad un grosso vaso verosimilmente venoso, e nel secondo, ad una ciste ovarica luteinica.

A parziale discolpa ci preme sottolineare al proposito che di fatto si trattava di due diagnosi molto precoci (rispettivamente al 24° e 25° giorno dall'inseminazione) alle quali abbiamo dedicato meno attenzione del dovuto sospinti forse da un eccesso di entusiasmo.

Esame trans-vaginale semplice Vs trans-vaginale bimanuale.

I parametri relativi alla diagnosi TV semplice, risultano nel loro complesso già relativamente accettabili, con la sola evidente incertezza del valore predittivo negativo, che giustifica il motivo per cui tutti i soggetti negativi richiedano una valutazione contestuale con la tecnica TV bimanuale.

D'altro canto, se consideriamo la sola TV bimanuale, confrontandola con le diagnosi di conferma in fase più avanzata, possiamo osservare come i valori dei suddetti parametri non si discostino sostanzialmente da quelli dell'ecografia trans-rettale classica, a conferma dell'affidabilità sostanziale di entrambi i metodi d'approccio ecografico (TV bimanuale e trans-rettale classico).

Una differenza sostanziale, però, tra il nostro approccio e quello trans-rettale classico sta nel fatto che nella nostra casistica su 150 diagnosi eseguite, solo nei 62 casi apparentemente negativi al primo approccio (49 neg. + 13 falsi neg.) (41%) si sarebbe reso necessario il ricorso alla contestuale visita trans-rettale, mentre, in ben 88 casi (59%) la diagnosi risultava già positiva alla sola scansione trans-vaginale semplice sia pur con un 2 casi di falsa positività (comunque connessi a diagnosi estremamente precoci 24° e 25° dì – fascia di minor attendibilità – vedi oltre).

In parole povere con l'approccio TV semplice si potrebbe comunque almeno dimezzare il ricorso all'esplorazione rettale (nelle nostre condizioni operative solo il 40% dei soggetti ne avrebbe avuto, in effetti bisogno, in presenza di un 60% di soggetti già positivi alla TV semplice).

Intervallo operativo ottimale.

In accordo con quanto prevedibile, nonostante nella prima delle tre fasce considerate (24-30; 31-37 e >38 dì) sia compresa più della metà dei casi da noi valutati, l'intervallo di massima attendibilità è ovviamente risultata quella più avanzata, anche se *l'intervallo operativo migliore potrebbe essere considerato quello compreso tra 31° e 37° giorno* in ragione anche del fatto che in tale periodo si raggiunge un interessante compromesso tra precocità, attendibilità, rapidità e facilità d'esecuzione con un margine molto ridotto d'errore.

Le diagnosi più precoci (tra 24°-30° dì), d'altro canto, richiedono anche un maggior impegno tecnico ed una particolare attenzione interpretativa dei riscontri ecografici, tanto che, spesso, in questi casi abbiamo ritenuto opportuno procedere ad una prima riconferma oltre il 30° giorno, in modo da limitare l'incidenza di errori, e di valutare l'eventuale insorgenza di interruzioni di gravidanza iatrogene.

Riassorbimenti embrionali.

Come già accennato nella parte introduttiva l'approccio diagnostico precoce associato alle conferme tardive ci ha anche permesso di rilevare alcuni episodi di riassorbimento embrionale conseguenti ad altrettante diagnosi precoci sicuramente positive.

Da un'attenta analisi delle cartelle cliniche individuali è emerso, infatti, che ben 9 soggetti avevano riassorbito il prodotto del concepimento, dal momento che alla visita di conferma non presentavano più un quadro gravidico ed in 1 caso siamo anche riusciti ad

evidenziarne ecograficamente le sequele cliniche in ambito uterino utero, consistenti in accumulo di materiale ecogenico, verosimilmente attribuibile a residui dell'embrione e dei relativi annessi, fluttuante in un contesto anecogeno denso.

È stato calcolato, quindi, che su 99 vacche effettivamente gravide ben 9 hanno presentato una negativizzazione della diagnosi sicuramente positiva alla prima scansione con un'incidenza percentuale pari a poco più del 9%, in accordo, se non addirittura leggermente inferiore, a quanto osservato da altri autori che in casistiche molto più ampie della nostra ne segnalavano un tasso di incidenza prossimo almeno al 12% ^[55].

5. CONCLUSIONI:

Come dimostrato dalle esperienze sin qui condotte, la vagina, per la sua strategica disposizione topografica, può rappresentare una valida via d'accesso all'indagine ecografica dell'apparato genitale interno anche in Medicina Veterinaria. Tale organo, inoltre, per le sue caratteristiche anatomiche ed istologiche offre, una resistenza meccanica ed un'elasticità migliore rispetto alla mucosa rettale.

In molti casi già la stretta adesione reciproca delle pareti vulvo-vaginali, ne rende il lume pressoché virtuale, favorendo sensibilmente la rapidità della diagnosi soprattutto nei soggetti positivi, a patto che le dimensioni dei sacchi placentari risultino abbastanza ampie. In questi casi, infatti, la semplice introduzione della sonda nella porzione più profonda del vestibolo vaginale, può già fornire immagini uterine di particolare nitidezza ed immediatezza interpretativa.

L'invasività e la complessità delle manualità dell'approccio TV semplice appaiono decisamente limitate e la vacca matura le tollera tranquillamente, mentre, le manze, non ancora avvezze a manipolazioni genitali, tendono a manifestare un maggior disagio alla stimolazione trans-vaginale anche in rapporto alle dimensioni della sonda da noi utilizzata, e, soprattutto, alla persistenza della plica imenale.

Almeno dal punto di vista teorico, ai fini dell'individuazione della condizione gravidica il metodo si presta meglio negli animali più giovani e nelle fasi più precoci (prima cioè che l'utero abbia raggiunto peso e dimensioni tali da dislocarlo verso la cavità addominale).

Le verifiche appena descritte dimostrano come questa via possa essere praticata con successo e rapidità nella vacca, e con l'esercizio, abbiamo già riscontrato progressivi miglioramenti anche nella sicurezza applicativa e nell'affidabilità diagnostica del metodo.

La via trans-vaginale semplice, associata, soprattutto nei casi negativi, a quella bi-manuale, permette un deciso incremento della precocità e dell'attendibilità diagnostica, almeno paragonabile all'ecografia trans-rettale .

In base alla nostra esperienza, il momento ottimale (per facilità d'esecuzione, attendibilità ed immediatezza) risulta collocabile tra 30° e 37° giorno dall'inseminazione. Ricordiamo al proposito che un anticipo medio anche di soli 10 giorni nella diagnosi di gravidanza potrebbe rivelarsi particolarmente utile per i soggetti non gravidi al contenimento dell'interparto, con un ritorno economico non indifferente e che può almeno parzialmente compensarne le spese.

La semplicità esecutiva del metodo e la ridotta traumaticità dell'esame rendono possibile l'esecuzione anche di diagnosi precoci (24°-30° giorno), che, però, sono più indaginose e richiedono più tempo, attenzione e integrazione con la tecnica bi-manuale.

La diagnosi nei casi positivi oltre il 30° giorno viene basata essenzialmente sulla molteplicità delle sezioni uterine presenti nei differenti piani di scansione, sui contenuti dell'organo (fluidi, membrane, etc....) e sull'aspetto delle pareti uterine, mentre, l'evidenziazione specifica del feto e/o delle ovaie, spesso, richiede un allungamento dei tempi di indagine e molteplici movimenti di rotazione e/o di lateralità della sonda, se non, addirittura, il ricorso al metodo bi-manuale.

Rispetto alla diagnosi ecografica trans-rettale, la via trans-vaginale risulta, in molti casi, più igienica eliminando molte occasioni di contatto fecale anche per l'operatore. Ricordiamo, al proposito che in tutti quei casi in cui la diagnosi trans-vaginale risulta positiva, (oltre il 50% dei casi nella nostra casistica) non risulterebbe più necessario ricorrere all'esplorazione rettale ^[1, 3].

In condizioni di allevamento intensivo e razionale, caratterizzato dalla disponibilità di strutture di cattura e di contenimento degli animali, e, ancor meglio, in gruppi di animali con attività riproduttiva sincronizzata, la tecnica potrebbe rivelarsi particolarmente indicata per individuare rapidamente i soggetti gravidi ad un primo screening sistematico, lasciando quelli apparentemente *vuoti* per un esame più dettagliato e completo, finalizzato ad un anticipo del loro recupero funzionale mediante interventi mirati e precoci.

Un miglioramento applicativo sarebbe, comunque, attuabile qualora le case produttrici delle apparecchiature rivolgessero un'attenzione particolare all'allestimento di sonde endocavitarie appositamente progettate per questa tipologia d'impiego. Sarebbe,

infatti, auspicabile l'assemblaggio di transducer dotati di frequenza 3,5-5 MHz. associata ad un'inclinazione e ad una forma più confacente alla conformazione del canale vaginale ^[1, 3].

A causa della limitatezza di questa casistica siamo consci della necessità di ulteriori e più approfondite esperienze e conferme in merito, ma, se la metodica dovesse rivelarsi veramente così efficiente, attendibile e soprattutto, così innocua, essa, gestita da mani esperte, potrebbe permettere un anticipo diagnostico di almeno una decina di giorni rispetto alla canonica data dei 40 giorni, attorno ai quali si richiede routinariamente l'espletamento del classico accertamento clinico di gravidanza.

Interessanti prospettive potrebbero, infine, aprirsi dall'impiego della via trans-vaginale anche in altre specie (ovi-caprine in particolare), in cui abbiamo anche noi condotto le prime sperimentazioni con esiti incoraggianti sostituendo la Tv bimanuale con il semplice sollevamento manuale dell'addome del paziente ^[1, 2].



Figura 3: TV semplice diagnosi positiva 28 gg. post-I.A.



Figura 4: TV semplice Diagnosi positiva 35 gg. post-I.A.



Figura 5: TV semplice Diagnosi positiva 45 gg. post-I.A.

BIBLIOGRAFIA.

1. Aria G., Botta R., Sbrana A., Panzani D., 2005, Accertamento di gravidanza per via ecografica trans-vaginale nella bovina. *Large Anim Rev*, 11, 2: 25-31.
2. Aria G., Zhan Shou, Botta R., Giuliotti L., Rota Al., 2004, Trans-vaginal echographic approach to early pregnancy diagnosis in small ruminants. *Ann. Fac. Med. Vet. Pisa*, vol. LVII, pp. 99-105.
3. Aria G., Zhan Shou, Botta R., Vannozzi I., 2005, Diagnosi ecografica di gravidanza per via trans-vaginale in bovini, ovini e suini: considerazioni tecnico applicative. *Atti III Congresso Nazionale SIRA, Roma*, volume unico, 84-87.
4. Bartrum R.J., Crow H.C. – *Real-Time Ultrasound: A Manual for Physicians and Technical Personnel*. W.B. Saunders Company – Philadelphia, 1983.
5. Bennett G.L., Echternkamp S.E., Gregory K.E., 1994, A model of litter size distribution in cattle. *J Anim Sci*, 76: 1789-1793.
6. Betteridge K.J., Eaglesome M.D., Randall G.C.B., Mitchell D., 1980, Collection, description and transfer of embryo from cattle 10-16 days after oestrus. *J Reprod Fertil*, 59: 205-216.
7. Botero O., Martinat-Botte F., Chevalier F., 1984, Diagnostic Precoce de Gestation par Echographie d'Ultrasons. *Journ. Rech. Porc. en France*, 16, 181-188.
8. Butler W.R., 2000, Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim Reprod Sci*, 60/61: 449-457.
9. Carnevale E.M., Oocyte transfer and gamete intrafallopian transfer in the mare. *An. Repr. Sc.*, 82-83: Res. and Pr. III, pp. 617-624, 15th Int. Congr. An. Repr., Porto Seguro, Brazil, 2004.
10. Catone G., Russo M., Malfatti A., Basile M., Barbato O., Pregnancy diagnosis and monitoring in Alpacas using transvaginal ultrasonography. *Atti del 12th Annual Conference EAVDI, Naples, Italy*, 2005.
11. Cella M., Camillo F., Lazzari S., Romagnoli S., Grassi F., 1988, Monitoraggio ecografico trans-addominale dell'accrescimento del feto ovino. *Ann. Fac. Med. Vet. Pisa*, vol. XLI, 283-300.
12. Chaffaux S., Valon F., Martinez J., 1982, Evolution de l'image échographique du produit de conception chez la vache. *Bull. Acad. Vét. Fr.*, 55: 213-221.

13. Chastant-Maillard S., Boin E., Grimard B., Mialot J-P, Ecografia dell'ovaio nella bovina. In: Collana di SUMMA – Esami Complementari in Clinica Bovina, ed. Point Vet. Italie, Milano (2004), pp. 93-99.
14. Committee on bovine reproductive nomenclature. Recommendation for standardizing bovine reproductive terms. *Cornell Vet* 1972, 62: 216-237.
15. Coutifaris C: Ectopic Pregnancy in: Knobil E. e Neill J.D.: - *Encyclopedia of Reproduction* -, Academic Press, New York, Vol. I, 2003.
16. Cremonesi F., Patologia delle salpingi, utero, cervice, vagina. In: *Manuale di Teriogenologia Bovina*. Sali G., Ed. Edagricole, Bologna, 1996, 251-293.
17. Curran S., Pierson R.A., Ginther O.J., 1986, Ultrasonographic appearance of the bovine conceptus from days 10 through 20. *JAVMA*, 189: 1289-1294.
18. Curran S., Pierson R.A., Ginther O.J., 1986, Ultrasonographic appearance of the bovine conceptus from days 20 through 60. *JAVMA*, 189: 1295-1302.
19. Day J.D., Weaver L.D., Franti C.E., 1995, Twin pregnancy diagnosis in Holstein cows: discriminatory powers and accuracy of diagnosis by transrectal palpation and outcome of twin pregnancies. *Can Vet J*, 36: 93-97.
20. De Vries A., 2006, Economic value of pregnancy in dairy cattle. *J Dairy Sci*, 89: 3876-3885.
21. DesCôteaux L., Carrière P.D., Durocher J., Ultrasonography of the reproductive system of the cow: basic principles, practical uses and economic aspects of this diagnostic tool in dairy production. *Atti del XXIV World Buiatrics Congress 2006*, Nice, France (www.ivis.org).
22. Domecq J.J., Skidmore A.L., Lloyd J.W., Kaneese J.B., 1997, Relationship between body condition scores and conception at first artificial insemination in a large dairy herd of high yielding Holstein cows. *J Dairy Sci*, 80: 113-120.
23. Eddy R.G., Davies O., David C., 1991, An economic assessment of twin births in British dairy herds. *Vet Rec*, 129: 526-529.
24. Esposito L., Infascelli F., Trotta Bruno V., Boni R., Nizza A., Diagnosi di gravidanza mediante ecografia e dosaggio del progesterone in ovini allevati nel meridione. *Proc. 2nd Meeting Natl. On: Studio dell'efficienza riprod. degli an. di interesse zoot.*, Bergamo, 1989, 79-84.
25. Etherington W.G., Martin S.W., Bonnett B., Johnson W.H., Miller R.B., Savane N.C., Dalton J.S., Montgomery M.E., 1988, Reproductive performance of dairy

- cows following treatment with cloprostenol 26 and/or. 40 days postpartum: A field trial. *Theriogen*, 29: 565-575.
26. Fissore R.A., Edmondson A.J., Pashen R.L., Bondurant R.H., 1986, The use of ultrasonography for the study of the bovine reproductive tract. II. Non-pregnant, pregnant and pathological conditions of the uterus. *Anim Reprod Sci*, 12: 167-177.
 27. Foote R.H., 1996, Review: dairy cattle reproductive physiology research and management-past progress and future prospects. *J Dairy Sci*, 79: 980-990.
 28. Forar A.L., Gay J.M., Hancock D.D., 1995, The frequency of endemic fetal loss in dairy cattle: a review. *Theriogen*, 43: 989-1000.
 29. Fricke P.M., Wiltbank M.C., 1999, Effect of milk production on the incidence of double ovulation in dairy cows. *Theriogen*, 52: 1133-1143.
 30. Gilbert R., Gilbert R.O., Frajblat M., Butler W.R., Guard C.L., Erb H.N., Roman H.B., The importance of early postpartum ovulation for reproduction in dairy cows. *Atti del XXIV World Buiatrics Congress 2006, Nice, France (www.ivis.org)*.
 31. Gnemmi G., 2001, Analisi economica dell'uso dell'ecografia in ginecologia buiatica. *Summa*, 6: 61-64.
 32. Gnemmi G., Maraboli C., Colloton J., 2005, Ultrasonografia in ginecologia buiatica. *Summa*, 5: 23-28.
 33. Goff A.K., 2002, Embryonic signals and survival. *Reprod Dom Anim*, 37: 133-139.
 34. Gonzalez F., Cabrera F., Batista M., Rodriguez N., Alamo D., Sulon J., Beckers J.-F., Garcia A., 2004, A comparison of diagnosis of pregnancy in the goat via trans-rectal ultrasound scanning, progesterone, and pregnancy-associated glycoprotein assays. *Theriogen*, 62:6:1108-1115.
 35. Gordon I., *Controlled reproduction in cattle & buffaloes*. Oxon: CAB International, 1996, p. 18.
 36. Graham T.W., Giri S.N., Daels P.F., Cullor J.S., Keen C.L., Thurmond M.C., Dellinger J.D., Stabenfeldt G.H., Osburn B.I., 1995, Association among prostaglandin F₂alpha, plasma zinc, copper and iron concentrations and fetal loss in cows and mares. *Theriogen*, 44: 379-390.
 37. Gurewitsch D. & Chervenak F.A.: *Ultrasound*. In: Knobil E. & Neill J.D., *Encyclopedia of Reproduction*, Academic Press, New York, Vol. IV, 2003.
 38. Hady P.J., Domecq J.J., Kaneene J.B., Frequency and precision of body condition scoring in dairy cattle. *J Dairy Sci*, 77: 1543-1547.

39. Hanzen C.H., Drion P.V., Lourtie O., Depierreux C., Christian E., 1999, Embryonic mortality. Part 1. Clinical aspects and etiological factors in the bovine species. *Ann Med Vet*, 145: 91-118.
40. Heuer C., Schukken Y.H., Dobbelaar P., 1999, Postpartum body condition score and results from the first test day milk as predictors of disease, fertility, yield, and culling in commercial dairy herds. *J Dairy Sci*, 82: 295-304.
41. Hussain A.M., Daniel R.C.W., 1991, Bovine endometritis: a review. *J.Vet. Med. Series A*, 38: 641.
42. Kähn W. & Leidl W., 1985, Sonographische befunde am uterus von stuten mit ultraschall bei einer fequenz von 5 Megahertz (MHz.). *Pferdeheilkunde*, 1: 239-246.
43. Kähn W., 1985, Zur trächtigkeitsdiagnose beim rind mittels ultraschall. *Tierärztl. Umsch.*, 40: 472-477.
44. Kähn W., Semeiotica Ecografia in: Sali G., - *Manuale di Teriogenologia Bovina*-. Ed. Edagricole, Bologna, 1996, pp.: 135-153.
45. Kähn W., *Veternary Reproductive Ultrasonography*. Schlutersche Ed., 1994.
46. Kanhai H.H., van Rijssel E.J., Meerman R.J., Gravenhorst J.B., 1986, Selective termination in quintuplet pregnancy during first trimester. *Lancet*, 1: 1447.
47. Kastelick J.P., Curran S., Ginther O.J., 1989, Accuracy of ultrasonography for pregnancy diagnosis on days 10 to 20 in heifers. *Theriogen*, 31: 813-820.
48. Kidder H.E., Barrett G.R., Casida L.E., 1952, A study of ovulations in six families of Holstein-Friesians. *J Dairy Sci*, 35: 436-444.
49. Kindahl H., Bekama M., Kask K., Königsson K., Gústafsson H., Odensvik K., 1999, Endocrine aspects of uterine involution in the cow. *Reprod Domestic Anim*, 34: 261-268.
50. Kinsel M.L., Marsh W.E., Ruegg P.L., Etherington W.G., 1998, Risk factors for twinning in dairy cows. *J Dairy Sci*, 81: 989-993.
51. Krogh M.A., Enevoldsen C., Determinants of metritis/endometritis in first lactation Danish Holsteins with records from systematic gynaecological examinations early post-partum. *Atti del XXIV World Buiatrics Congress 2006, Nice, France* (www.ivis.org).
52. Labèrnia J., López-Gatius F., Santolaria P., López-Béjar M., Rutllant J., 1996, Influence of management factors on pregnancy in dairy cattle. *Theriogen*, 45: 1247-1253.

53. Leroy J.L.M.R., Vanholder T., Delanghe J.R., Opsomer G., Van Soom A., Bols P.E.J., Dewulf J., de Kruif A., Trans-vaginal ultrasound-guide follicle aspiration in high producing dairy cattle to study the oocyte's intra-follicular environment early post-partum. W.S. 07, 15thInt.Congr.An.Repr., Porto Seguro, Brazil 2004.
54. López-Gatius F., Labèrnia J., Santolaria P., López-Béjar M., Rutllant J., 1996, Effect of reproductive disorder previous to conception on pregnancy attrition in dairy cows. *Theriogen*, 46: 643-648.
55. López-Gatius F., Santolaria P., Yaniz J., Rutllant J., López-Béjar M., 2002, Factor affecting pregnancy loss from gestation day 38 to 90 in lactating dairy cows from a single herd. *Theriogen*, 57 (4): 1251-1261.
56. Macpherson M.L., Reimer J.M., 2000, Twin reduction in the mare: current options. *Anim Reprod Sci*, 60/61: 233-244.
57. Mansour R.T., Aboulghar M.A., Serour G.I., Sattar M.A., Kamal A., Amin Y.M., 1999, Multifetal pregnancy reduction: modification of the technique and analysis of the outcome. *Fertil Steril*, 71: 380-384.
58. Markusfeld-Nir O., 1997, Epidemiology of bovine abortion in Israeli dairy herds. *Prev Vet Med*, 31: 245-255.
59. Mee J.F. & Dalemans I., Diagnosis of endometritis in dairy cows using a novel intravaginal scoop (Metrichecktm). Atti del XXIV World Buiatrics Congress 2006, Nice, France (www.ivis.org).
60. Morrow C.J., Berg M., 2004, Ultrasound-guided trans-vaginal collection of amniotic and/or allantoic fluid from cattle. *Theriogen*, 59:1:539.
61. Nielen M., Schukken Y.H., Scholl D.T., WilBrink H.J., Brand A., 1989, Twinning in dairy cattle: a study of risk factors and effects. *Theriogen*, 32: 845-862.
62. Oltenacu P.A., Ferguson J.D., Lednor A.J., 1990, Economic evaluation of pregnancy diagnosis in dairy cattle: a decision analysis approach. *J Dairy Sci*, 73: 2826-2831.
63. Pecile A.M.: Aspetti tecnici e biologici del prelievo trans-vaginale ecoguidato di ovociti da utilizzare in programmi di riproduzione assistita nella bovina adulta e in quella prepubere. Tesi Dott. di Ric. in Clin. Bovina, Fac. Med. Vet. Milano, XII° ciclo, a.a. 1996-'99.
64. Pierson R.A. & Ginther O.J., 1984, Ultrasonography for detection of pregnancy and study of embryonic development in heifers. *Theriogen*, 22: 225-233.

65. Pierson R.A. & Ginther O.J., 1987, Ultrasonographic appearance of the bovine uterus during the estrous cycle. JAVMA, 190: 995-1001.
66. Royal M.D., Darwash A.O., Flint A.P.F., Webb R., Woolliams J.A., Lamming .E., 2000, Declining fertility in dairy cattle: change in traditional and endocrine parameters of fertility. Anim Sci, 70: 487-501.
67. Ruegg P.L., Milton R.L., 1995, Body condition scores of Holstein cows on Prince Edward Island, Canada: relationship with yield, reproductive performance and disease. J Dairy Sci, 78: 552-564.
68. Sheldon M., Herath I.M., Bryant S., Dobson C.E., Bovine endometritis: pathofisiology and mechanisms. Atti del XXIV World Buiatrics Congress 2006, Nice, France (www.ivis.org).
69. Suriyasathaporn W., Nielen M., Dieleman S.J., Brand A., Noordhuizen-Strasse E.N., Schukken Y.H., 1998, A cox proportional-hazards model with time-dependent covarities to evaluate the relationship between body-condition score and the risks of the first insemination and pregnancy in a high-producing dairy herd. Prev Vet Med, 37: 159-72.
70. Tainturier B., Tainturier D., Bencharif D., Sessaggio precoce del feto mediante ecografica nella bovina. In: Collana di SUMMA – Esami Complementari in Clinica Bovina , ed. Point Vet. Italie, Milano (2004), pp. 87-97.
71. Taverne M.A.M., Szenci O., Szétag J., Piros A., 1985, Pregnancy diagnosis in cow with linear-array real-time ultrasound scanning: a preliminary note. The Veterinary Quartely, 7: 264-270.
72. Timor-Tritsch I.E., Peisner D.B., Raju S., 1990, Sonoembriology: an organ-oriented approach using a high frequency vaginal probe. Journ. Cl. Ultrasound, 18 (4): 86-298.
73. Vanroose G., de Kruif A., Van Soom A., 2000, Embryonic mortality-pathogen interactions. Anim Reprod Sci, 60/61: 131-143.
74. Vollmerhaus B., 1957, Untersuchungen über die normalen zyklischen Veränderungen der Uterusschleimhaut des Rindes. Zentbl. Vet. Med., 4: 18-50.
75. Winters L.M., Green W.W., Comstock R.E., 1942, Prenatal development of the bovine. Univ. Minn. Agric. Exper. Sta., Techn. Bul., 151 : 1-44.
76. Youngquist R.S., Current Therapy in Large Animal Theriogenology. Ed. W. B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, 1997.